

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



**Utilidad de la PAAF en el Diagnóstico del Adenoma
Pleomórfico de Glándula Salival con Correlación
Inmunocito-histológica**

TESIS DOCTORAL

Blanca María Vicandi Plaza

Madrid 2015

AGRADECIMIENTOS

A los doctores M^a del Pilar González-Peramato Gutiérrez por su tesón, su constante ánimo, ayuda y buen hacer y José Antonio Jimenez Heffernan, por su disponibilidad y buenos consejos, directores de este trabajo.

A mis compañeros de la sección de Citología del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz, Dr. José M^a Viguer Garcia Moreno, Dra. López-Ferrer y Dra. González-Peramato, sin cuya colaboración en la obtención del material de PAAF y su destreza en los diagnósticos, no hubiese sido posible la realización de esta tesis. También quiero agradecer a la Dra Ana Rodriguez, su apoyo.

A la Dra. M. Patrón, sin cuyo saber y dedicación al estudio de la glándula salival, no hubiésemos podido realizar este trabajo.

Al personal de laboratorio de Anatomía Patológica, en especial a Petri y a los técnicos de nuestro laboratorio de citología.

A la Dra. Marta Mendiola, por su aportación a la comprensión de la patología molecular.

A la Dra. Inmaculada Santos, por su ayuda en la edición de esta tesis.

A mi amiga la Dra. Maribel Torres, por su apoyo desinteresado.

A mi marido e hijos, por su comprensión y ayuda en los momentos críticos de elaboración de este trabajo.

A mis padres

A Javier y a mis hijos Javier y Ana

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
	ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA SALIVAL	2
	HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA SALIVAL.....	2
	INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA GLÁNDULA SALIVAL NORMAL.....	4
	TUMORES DE LA GLÁNDULA SALIVAL.....	5
	Clasificación histológica de los tumores de la glándula salival. OMS 2005	5
	Clasificación de los tumores de la glándula salival. Rosai 2011	6
	Gradación de los tumores de la glándula salival. “American Joint Committee on Cancer”	6
	HISTOGÉNESIS DE LAS NEOPLASIAS DE LA GLÁNDULA SALIVAL.....	7
	IMMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS TUMORES DE LA GLÁNDULA SALIVAL	10
	ESTADIFICACIÓN.....	13
	PAAF EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS LESIONES DE LA GLÁNDULA SALIVAL	17
	ADENOMA PLEOMÓRFICO.....	20
	Aspectos clínicos	20
	Características macroscópicas	20
	Características microscópicas	21
	Punción Aspiración con Aguja Fina	25
	Inmunohistoquímica.....	27
	Tratamiento	28
	Genética molecular.....	33
	Resumen.....	36
II	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
	1. HIPÓTESIS.....	38
	2. OBJETIVOS.....	39
III	MATERIAL Y MÉTODOS	40
	MATERIAL	41
	Grupo 1	41
	Grupo 2.....	41
	Grupo 3	41
	MÉTODOS.....	43
	Estudio citológico.....	43

<i>Obtención de las muestras.....</i>	<i>43</i>
<i>Preparación de las muestras.....</i>	<i>43</i>
<i>Interpretación de los frotis</i>	<i>46</i>
<i>Correlación cito-histológica.....</i>	<i>47</i>
Estudio histológico	48
<i>Técnica de inmunohistoquímica.....</i>	<i>49</i>
IV RESULTADOS.....	50
APARTADO 1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PUNCIÓN ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA DEL ADENOMA PLEOMÓRFICO EN 212 PACIENTES DURANTE EL PRIMER PERIODO 1980-1994. (GRUPO 1)	51
APARTADO 2. RESULTADOS DEL ESTUDIO COMPARATIVO EN EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DEL ADENOMA PLEOMÓRFICO DURANTE DOS PERIODOS DE TIEMPO (1980- 1994 Y 1995-2003). (GRUPO 2)	53
APARTADO 3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PAAF DE ADENOMA PLEOMÓRFICO EN 221 PACIENTES DURANTE EL TERCER PERIODO 2004-2011. (GRUPO 3)	55
APARTADO 4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DIAGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS EN LOS TRES PERIODOS	55
APARTADO 5. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES EPITELIALES Y MIOEPITELIALES	58
Expresión de los marcadores IHQ en la glándula salival normal	58
Expresión de los marcadores IHQ en biopsias de AP.....	59
<i>Inmunoexpresión en zonas parecidas a mioepitelio</i>	<i>59</i>
<i>Inmunoexpresión en el mioepitelio modificado mixoide.....</i>	<i>61</i>
<i>Inmunoexpresión en el mioepitelio modificado condroide.....</i>	<i>62</i>
<i>Inmunoexpresión en el mioepitelio transformado epitelioide.....</i>	<i>63</i>
<i>Inmunoexpresión en el mioepitelio transformado escamoso.....</i>	<i>64</i>
<i>Inmunoexpresión en el mioepitelio transformado cribiforme</i>	<i>65</i>
APARTADO 6. VALORACIÓN CUANTITATIVA DE LOS MARCADORES EPITELIALES Y MIOEPITELIALES EN BIOPSIA DE AP	66
Inmunoexpresión de CK19.....	66
Inmunoexpresión de calponina	68
Inmunoexpresión de p63	70
Inmunoexpresión de PAGF.....	71
Inmunoexpresión de WT1.....	73
APARTADO 7. EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOCITOQUÍMICOS EN PAAF DE AP	75
Estudio ICQ de la PAAF en el AP	80

V	DISCUSIÓN	82
	(1) AP CON UN CUADRO CITOLÓGICO TÍPICO Y SIN PROBLEMAS DIAGNÓSTICOS	84
	(2) AP CON ATIPIA CELULAR	85
	(3) AP CON CAMBIOS QUIÍSTICOS	87
	(4) AP CON PATRÓN CILINDROMATOSO	88
	ERRORES ESPORÁDICOS	90
	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	92
	CK19.....	92
	Calponina	93
	P63.....	94
	PAGF.....	95
	WT1	96
	PLAG1	97
VI	CONCLUSIONES	99
VII	RESUMEN	101
VIII	SUMMARY	104
IX	REFERENCIAS	107
X	ANEXOS	120

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Número</i>		<i>Página</i>
Figura 1.	Anatomía de la glándula parótida. Fuente: www.asisccmaxilo.com	2
Figura 2.	Glándula salival normal: (A) Histología, acinos y conductos estriados. (B) PAAF estructuras acinares y conducto intercalar y estriado.	3
Figura 3.	Estructura de la glándula salival. Fuente: WB Saunders 2002.....	3
Figura 4.	Similitud entre los diferentes tumores y las estructuras epiteliales normales de la glándula salival. (A): Acino, (I): conducto intercalar, (S): conducto estriado, (SG): glándula sebácea, (E): conducto excretor. Fuente: cita (11).	8
Figura 5.	Propuesta de clasificación de los tumores de glándula salival. GAGs: Glucosaminoglicanos. Fuente: cita (10).	9
Figura 6.	Positividad en acinos y conductos intercalares, negatividad en los conductos estriados y excretores con la proteína SOX10 en una glándula salival normal. Fuente: cita (12).	10
Figura 7.	Estadio I. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm	14
Figura 8.	Estadio II. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm	15
Figura 9.	Estadio III. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm	15
Figura 10.	Estadio IVA. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm	16
Figura 11.	Estadio IVB. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm	16
Figura 12.	Estadio IVC. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm	17
Figura 13.	(A) y (B) Cápsula del AP. Clara delimitación del tumor con respecto al parénquima salival normal.	21
Figura 14.	(A) AP con componente epitelial tubular y (B) mioepitelial.	21
Figura 15.	(A) AP con material de secreción eosinófila. (B) Metaplasia escamosa en AP.	23
Figura 16.	(A) AP con células sebáceas. (B) AP con apariencia de schwannoma. ...	23
Figura 17.	(A) AP con hábito plasmocitoide. (B) AP con hialinización de las células mioepiteliales.	24
Figura 18.	(A) y (B) AP con patrón cilindromatoso.....	24
Figura 19.	(A) AP con diferenciación condroide. (B) AP con transformación quística.	25

Figura 20.	(A) PAAF de AP con predominio de células plasmocitoides. (B) AP de predominio mixocondroide.	25
Figura 21.	(A) PAAF de AP teñida con Diff-Quik. Estroma característico en rayos de sol. (B) AP teñido con Papanicolaou en donde se identifican mejor los detalles celulares.	26
Figura 22.	Parotidectomía superficial. Fuente:www.asisccmaxilo.com	28
Figura 23.	Parotidectomía total. Fuente:www.asisccmaxilo.com.....	29
Figura 24.	Parotidectomia radical con extirpación del lóbulo superficial y profundo de la parótida derecha, incluyendo el nervio facial. Tronco del nervio facial a la salida del agujero estilomastoideo.....	29
Figura 25.	(A) Injerto de nervio auricular contralateral (lado izquierdo) con tres ramas. (B) Defecto del nervio facial extirpado entre el tronco y las ramas terminales. (C) Puenteado del defecto con el injerto del nervio auricular con suturas microquirúrgicas epineurales.....	30
Figura 26.	(A) Enucleación intracapsular. (B) Enucleación extracapsular. (C) Disección extracapsular (DEC). Fuente: cita (70).	30
Figura 27.	Denominación de la parotidectomía dependiendo de la amplitud de la resección. I: lateral parcial craneal, II: lateral parcial caudal, denominada cola de parótida, III y IV: profunda craneal y caudal, F: nervio facial, St: conducto de Stenon. Fuente: cita (72).	31
Figura 28.	Incidencia del síndrome de Frey en relación a la extensión de la cirugía. TP: parotidectomía total, SP: parotidectomía superficial, PSP: parotidectomía parcial superficial. Fuente: cita (73).	32
Figura 29.	Incidencia de parálisis facial temporal y permanente en relación a la extensión de la cirugía. TP: parotidectomía total, SP: parotidectomía superficial, PSP: parotidectomía parcial superficial. Fuente: cita (73).	32
Figura 30.	Tinción de Papanicolaou.....	44
Figura 31.	Tinción de Diff-Quik.....	44
Figura 32.	Citología en medio líquido.....	45
Figura 33.	(A) H/E de una glándula salival normal. (B) Tinción positiva con CK19 de acinos, conductos intercalares y excretores. (C) Tinción del mioepitelio con calponina. (D) Tinción del mioepitelio o células basales con p63. (E) Ausencia de inmunotinción con PAGF. (F) Inmunotinción positiva en las células endoteliales de estructuras vasculares del tejido conectivo con WT1.....	59
Figura 34.	(A) H/E imagen de un AP con diferenciación luminal y paraluminal. (B) Intensa expresión luminal con CK19. (C) Moderada positividad paraluminal con calponina. (D) Intensa inmunotinción con p63. (E) Moderada inmunotinción con PAGF. (F) Intensa expresión con WT1 de localización citoplasmática.....	60

Figura 35.	(A) H/E de células fusiformes parecidas a mioepitelio en el AP. (B) Intensa inmunotinción de estas células con la calponina.....	61
Figura 36.	(A) Detalle de las áreas condromixoides con H/E. (B) Destaca la intensa inmunotinción con WT1.....	61
Figura 37.	(A) H/E de células plasmocitoides, pertenecientes al grupo de mioepitelio modificado. (B) Intensa inmunotinción con WT1.	61
Figura 38.	(A) Mioepitelio modificado mixoide con H/E. (B) Ausencia de CK19. (C) Ausencia de calponina. (D) Débil positividad con p63. (E) Intensa positividad con PAGF. (F) Expresión citoplasmática de WT1.	62
Figura 39.	(A) Zona de mioepitelio modificado condroide con H/E. (B) Muy discreta positividad para las zonas celulares paracondroides con CK19. (C) Negatividad para calponina. (D) Ausencia de expresión de p63. (E) Positividad para PAGF. (F) Positividad muy intensa, sobre todo en las áreas paracondroides, con WT1.	63
Figura 40.	(A) Área de mioepitelio transformado epiteloide con H/E. (B) Escasa tinción con CK19, (C) con calponina y (D) con p63. (E) Moderada tinción, sobre todo en las áreas mixoides, con PAGF. (F) Intensa positividad con WT1.	64
Figura 41.	(A) Mioepitelio transformado escamoso con H/E. (B) Tinción positiva con CK19 en los nidos escamosos. (C) Moderada positividad en el componente periescamoso con calponina, (D) con p63 y (E) con PAGF. (F) Intensa positividad con WT1.....	65
Figura 42.	(A) Area de mioepitelio transformado basaloide. (B) Escasa tinción con CK19. (C) Apenas se identifica positividad con calponina. (D) Positividad intensa con p63. (E) Ligera expresión de PAGF y (F) intensa con WT1.....	66
Figura 43.	(A) AP celular. (B) Inmunotinción con CK19. (C) PAAF con abundante celularidad de disposición tubular. (D) CK 19 positiva. (E) PAAF con celularidad predominante sobre el estroma. (F) CK 19 negativa.	77
Figura 44.	(A) PAAF con componente celular tubular. (B) Tinción con PAGF mostrando células positivas. (C) Moderada positividad en células sueltas con PAGF. (D) PAGF con tinción positiva en las células fusiformes. (E) Expresión de PAGF en áreas con habito plasmocitoide. (F) Intensa positividad para WT1 citoplasmático en áreas plasmocitoides.....	78
Figura 45.	(A) PAAF de AP, Diff-Quik. (B) PLAG1 con positividad nuclear en células del estroma. (C) y (D) Expresión nuclear en el epitelio/mioepitelio.....	79
Figura 46.	(A) Técnica de Diff-Quik de un AP típico con matriz condromixoide y celularidad plasmocitoide. (B) Negatividad para	

	CK19. (C) Positividad con PAGF tanto en células plasmocitoides como fusiformes. (D) Intensa positividad para WT1.....	79
Figura 47.	(A) PAAF de AP teñido con Diff-Quik con el típico estroma fibrilar metacromático y células plasmocitoides inmersas en él. (B) PAAF de AP teñido con Papanicolaou con células fusiformes.....	84
Figura 48.	(A) Atipia en AP con Diff-Quik y (B) con Papanicolaou.....	85
Figura 49.	(A) Frotis de AP teñido con Papanicolaou con áreas focales de núcleos desnudos con pleomorfismo y atipia. (B) Estudio histológico del AP con H/E que muestra ocasionales células atípicas.	86
Figura 50.	(A) AP con múltiples quistes. (B) PAAF con fondo hemato-quístico y ausencia de componente epitelial.	87
Figura 51.	(A) PAAF de AP con patrón cilindromatoso. (B) AP con múltiples cilindros de estroma tapizados por células mioepiteliales.....	89
Figura 52.	(A) Perforación nuclear con Diff-Quik y (B) con Papanicolaou.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
<i>Tabla 1.</i> Expresión IHQ de marcadores epiteliales y musculares en una glándula salival normal. EMA: antígeno epitelial de membrana, CEA: Antígeno carcinoembrionario.	4
<i>Tabla 2.</i> Clasificación de los tumores de la glándulas salival. Fuente: cita (2).	5
<i>Tabla 3.</i> Clasificación de los tumores de la glándula salival. Fuente: cita (3).	6
<i>Tabla 4.</i> Resumen de la utilidad de algunos marcadores inmunohistoquímicos en los tumores de la glándula salival. GS: glándula salival, AE1/AE3: CK bajo y alto peso molecular, EMA: antígeno epitelial de membrana, CEA: antígeno carcinoembrionario, SMA: actina músculo liso, PAGF: proteína ácida gliofibrilar. Fuente: cita (13).	12
<i>Tabla 5.</i> Edad, género, localización y diagnóstico por PAAF de los 40 casos de AP estudiados con técnicas de inmunohisto-citoquímica. F: femenino, M: masculino.	42
<i>Tabla 6.</i> Anticuerpos: dilución, clon, casa comercial y localización del marcaje.	46
<i>Tabla 7.</i> Casos erróneamente diagnosticados de AP (falsos positivos).	56
<i>Tabla 8.</i> Casos de AP en biopsia con un diagnostico citológico previo erróneo (falsos negativos).	56
<i>Tabla 9.</i> Punciones diagnosticadas de AP realizadas desde 1980 hasta 2011 inclusive.	57
<i>Tabla 10.</i> Correlación cito-histológica de los casos diagnosticados por PAAF de AP.	57
<i>Tabla 11.</i> Porcentaje de los diferentes tipos de mioepitelio evaluado en biopsias de AP con H/E. Valoración de CK 19. (a) 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. La intensidad fue de +++. (b) único caso CK19 negativo con presencia de áreas parecidas a mioepitelio aunque con solo un 5%.	67
<i>Tabla 12.</i> Tinción de CK19 en las distintas zonas del AP, siendo positiva la tinción en las áreas parecidas a mioepitelio.	68
<i>Tabla 13.</i> Porcentaje e intensidad de inmunoeexpresión de calponina en biopsias de AP. a: 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. +, ligera. ++, moderada. +++, intensa.	69
<i>Tabla 14.</i> Porcentaje e intensidad de inmunoeexpresión de p63 en biopsias de AP. a: 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. +, ligera. ++, moderada. +++, intensa.	70

<i>Tabla 15.</i>	Porcentaje e intensidad de inmunoeexpresión de PAGF en biopsias de AP. (a) 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. +, ligera. ++, moderada. +++, intensa.	72
<i>Tabla 16.</i>	Porcentaje e intensidad de inmunoeexpresión de WT1 en biopsias de AP. (a) 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. +, ligera. ++, moderada. +++, intensa.	74
<i>Tabla 17.</i>	Resumen de los resultados de la inmunohistoquímica (calponina, p63, PAGF y WT1) en los 40 casos de biopsias.	75
<i>Tabla 18.</i>	Casos de citología clasificados como de predominio celular (PC): 1; condromixioide (CM): 15; o mixtos: 24. Técnicas de inmunocitoquímica realizadas en citología: CK19, PAGF, WT1 y PLAG1. NH: no hecho. NEC: no evaluable por tinción citoplasmática. 0=ningún célula teñida; 1=<del 10%; 2=10-50%; 3=50-100%.....	80
<i>Tabla 19.</i>	Inmunoeexpresión de los marcadores en citología: CK19, PAGF, WT1 y PLAG1 en relación a los distintos tipos de AP.....	81
<i>Tabla 20.</i>	Resultados de la inmunotinción (CK19, PAGF, WT1 y PLAG1) en citología. NH: no hecho. NEC: no evaluable por tinción citoplasmática.....	81

GLOSARIO

AJCC:	American Joint Committee on Cáncer
AP:	Adenoma Pleomórfico
CAQ:	Carcinoma adenoide quístico
CK:	Citoqueratina
CEA:	Antígeno carcinoembrionario
CM:	Condromixoide
DEC:	Dissección extracapsular
EMA:	Antígeno epitelial de membrana
H/E:	Hematoxilina Eosina
IHQ:	Inmunohistoquímica
ICQ	Inmunocitoquímica
IUCC:	Union for International Cáncer Control
NOS:	Not otherwise specified
OMS:	Organización mundial de la salud
PAAF:	Punción aspiración con aguja fina
PAGF:	Proteína ácida gliofibrilar
PC:	Predominio celular
PPS:	Parotidectomía parcial superficial
PS:	Parotidectomía superficial

I INTRODUCCIÓN

ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA SALIVAL

Las glándulas salivales son órganos exocrinos responsables de la producción y secreción de la saliva. Se dividen en glándulas salivales mayores: parótida, submaxilar (submandibular) y sublingual y glándulas salivales menores. Estas últimas son muy numerosas y de distribución muy amplia tanto en la boca como en la orofaringe, así como en el tracto respiratorio superior, tractos senonasales y senos paranasales. La glándula parótida está compuesta por un lóbulo superficial y otro más pequeño profundo, separados ambos por el nervio facial (Fig. 1).

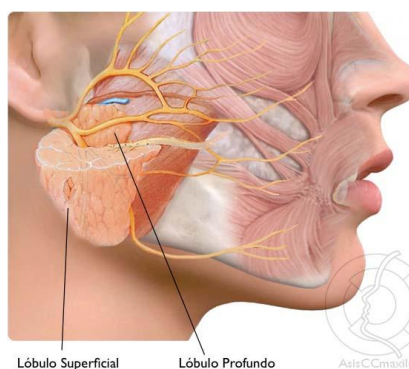


Figura 1. Anatomía de la glándula parótida. Fuente: www.asisccmaxilo.com.

HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA SALIVAL

Microscópicamente, las glándulas salivales son glándulas exocrinas constituidas por una porción ductal y otra acinar, pudiendo ésta última ser de tipo serosa o mucosa. La glándula parótida es exclusivamente serosa, la submaxilar es mixta de predominio seroso y la sublingual es, así mismo, mixta pero de predominio mucoso. El conducto intercalar y los acinos representan la porción terminal del sistema denominado unidad ductoacinar, que se evidencia tanto en los cortes histológicos (Fig. 2A) como en el material citológico obtenido por punción aspiración con aguja fina (PAAF) (Fig. 2B).

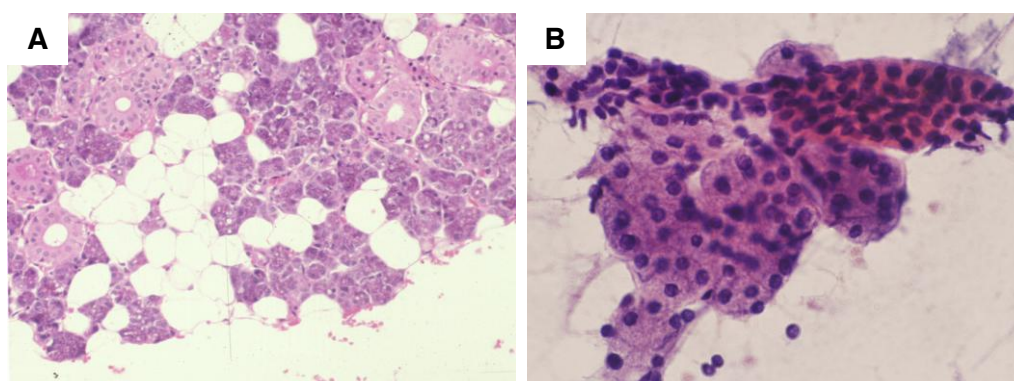


Figura 2. Glándula salival normal: (A) Histología, acinos y conductos estriados. (B) PAAF estructuras acinares y conducto intercalar y estriado.

La estructura de la glándula salival se encuentra organizada en dos niveles: Las células lumbinales (acinares y ductales) y las células paralumbinales (mioepiteliales y basales). Los acinos y los conductos intercalares están rodeados por células mioepiteliales, mientras que los conductos estriados y los subsiguientes están soportados por células basales. Las células mioepiteliales son planas, de morfología variable y no se identifican bien con el microscopio óptico convencional. Estas tienen prolongaciones contráctiles que se extienden sobre la superficie epitelial y abrazan la unidad secretora. La propiedad más importante de las células mioepiteliales es su naturaleza dual epitelial/mioide. Las características de músculo liso les confieren mayor capacidad de contractibilidad, permitiéndoles aumentar la presión sobre las células secretoras e impulsar la salida de la saliva a la cavidad oral (Fig. 3).

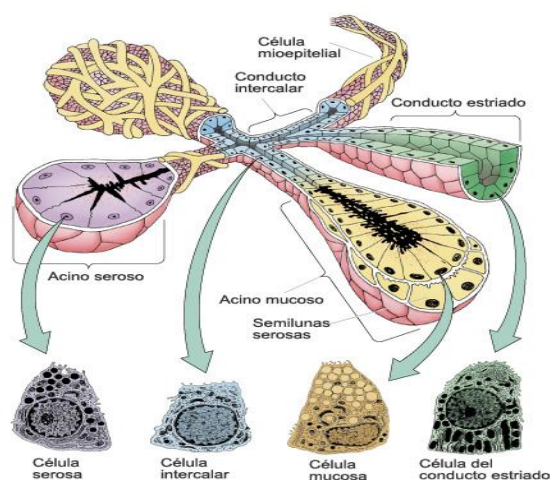


Figura 3. Estructura de la glándula salival. Fuente: WB Saunders 2002.

INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA GLÁNDULA SALIVAL NORMAL

Las células lumbinales expresan citoqueratinas (CK) de bajo peso molecular (CK 7, 8, 18 y 19), antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígeno de membrana epitelial (EMA).

Las células paralumbinales expresan citoqueratinas de alto peso molecular tales como 34 β E12, CK14 y CK 5/6, además muestran inmunoeexpresión con anticuerpos contra las proteínas mioideas tales como actina muscular específica, actina de músculo liso o calponina. La p63 también es un buen marcador de las células paralumbinales, tanto basales como mioepiteliales normales, así como de su contrapartida neoplásica. Sin embargo, la p63 no es totalmente específica para las células basales y mioepiteliales ya que las células escamosas normales y neoplásicas expresan este marcador. El CD10 también puede utilizarse como marcador mioepitelial pero carece de especificidad. Otro marcador mioepitelial es la maspina, un inhibidor de la serina proteasa B, que funciona como supresor tumoral. En la glándula salival normal la maspina se expresa selectivamente en el núcleo y citoplasma de las células mioepiteliales (1). La tabla 1 recoge la expresión inmunohistoquímica (IHQ) en las células lumbinales y paralumbinales normales.

AC	LUMINAL	MIOEPITELIAL
CK 7	+	-
CK 8,18,19	+	-
CK 14	-	+
34 β E12	-	+
EMA	+	-
CEA	+	-
ACTINA	-	+
CALPONINA	-	+
P63	-	+
CD10	-	+
MASPINA	-	+

Tabla 1. Expresión IHQ de marcadores epiteliales y musculares en una glándula salival normal. EMA: antígeno epitelial de membrana, CEA: Antígeno carcinoembrionario.

TUMORES DE LA GLÁNDULA SALIVAL

Actualmente se utiliza la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2) que hace hincapié en la distinción entre tumores benignos (adenomas) y malignos (carcinomas) (Tabla 2).

Clasificación histológica de los tumores de la glándula salival.

OMS 2005

TUMORES EPITELIALES MALIGNOS	TUMORES EPITELIALES BENIGNOS
Carcinoma de células acinares	Adenoma pleomórfico (AP)
Carcinoma mucoepidermoide	Mioepitelioma
Carcinoma adenoide quístico (CAQ)	Adenoma de células basales
Adenocarcinoma polimorfo de bajo grado	Tumor de Warthin
Carcinoma epi-mioepitelial	Oncocitoma
Carcinoma de célula clara, NOS	Adenoma sebáceo
Carcinosarcoma	Sialoadenoma papilífero
Adenoma pleomórfico metastatizante	Linfadenoma Sebáceo No sebáceo
Carcinoma epidermoide	Papiloma ductal
Carcinoma de células pequeñas	Invertido
Carcinoma de célula grande	Intraductal
Carcinoma linfoepitelial	Cistadenoma
Sialoblastoma	
Adenocarcinoma de células basales	
Carcinoma sebáceo	
Linfadenocarcinoma sebáceo	
Cistadenocarcinoma	
Cistadenocarcinoma cribiforme de bajo grado	
Adenocarcinoma mucinoso	
Carcinoma oncocítico	
Carcinoma ductal salival	
Adenocarcinoma NOS	
Carcinoma mioepitelial	
Carcinoma ex adenoma pleomorfo	

Tabla 2. Clasificación de los tumores de la glándulas salival. Fuente: cita (2).

Sin embargo, la clasificación de los tumores de la glándula salival ha resultado ser una tarea difícil y frustrante (3). Es incluso más compleja que la de algunos órganos como la mama y las glándulas sudoríparas con los que, de alguna manera, están relacionados. Uno de los mayores obstáculos es que, los tumores de la glándula salival, o bien derivan o bien se diferencian hacia la misma línea celular, epitelial (ductal o acinar) o mioepitelial. Esto produce una superposición de patrones, añadiéndose el

hecho de que a su vez estas células pueden sufrir cambios metaplásicos (oncocíticos, sebáceos, escamosos y condroides). Por ello, algunos autores (3) agrupan los tumores, siempre que sea posible, según la línea de diferenciación mas predominante, seguida de una distinción entre los tumores benignos y malignos dentro de cada grupo.

Clasificación de los tumores de la glándula salival. Rosai 2011

TUMORES DE LA GLÁNDULA SALIVAL
Tumores con Metaplasia Estromal
Tumor mixto benigno (AP)
Tumor mixto maligno
Tumores con Cambios Oncocíticos
Adenoma oncocítico y Carcinoma oncocítico
Tumor de Warthin
Adenoma Monomorfo
Adenoma de células basales y adenocarcinoma
Tumores con Diferenciación Sebácea
Tumores con Diferenciación Mioepitelial
Tumores con Cambios hacia Célula Clara
Carcinoma Mucoepidermoide
Carcinoma de Células Acinares y Secretor
Carcinoma Adenoide Quístico
Tumores Ductales de la Glándula Salival
Adenocarcinoma Polimorfo de Bajo Grado
Adenocarcinoma Papilar
Carcinoma Epidermoide
Carcinoma de Células Pequeñas y Otros Carcinomas Neuroendocrinos
Carcinoma Parecido al Linfopitelioma
Otros Carcinomas Primarios
Linfomas Malignos
Otras Neoplasias Primarias
Tumores Metastásicos

Tabla 3. Clasificación de los tumores de la glándula salival. Fuente: cita (3).

Gradación de los tumores de la glándula salival. “American Joint Committee on Cancer”

Además, los carcinomas de la glándula salival son clasificados según el “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) o la “Union for International Cancer

Control” (UICC) en bajo, intermedio y alto grado. Los de bajo grado son: carcinoma mucoepidermoide de bajo grado, carcinoma de células acinares, adenocarcinoma de células basales, adenocarcinoma polimorfo de bajo grado, cistoadenocarcinoma cribiforme de bajo grado, carcinoma secretor análogo al de la mama, cistoadenocarcinoma, carcinoma de células claras y carcinoma epi-mioepitelial. Los de grado intermedio son: carcinoma mucoepidermoide de grado intermedio, carcinoma adenoide quístico (CAQ) tubular y cribiforme, carcinoma mioepitelial y adenocarcinoma mucinoso. Y, por último, los de alto grado son: carcinoma mucoepidermoide de alto grado, CAQ indiferenciado, carcinomas de los conductos, adenocarcinoma “not otherwise specified” (NOS), carcinoma oncocítico, carcinoma epidermoide, carcinosarcoma, carcinoma de célula pequeña, carcinoma de célula grande, carcinoma sebáceo, carcinoma linfoepitelial, carcinoma de células acinares desdiferenciado y adenocarcinoma de células basales desdiferenciado. (4)

HISTOGÉNESIS DE LAS NEOPLASIAS DE LA GLÁNDULA SALIVAL

En las últimas décadas, la histogénesis de los diferentes tipos de tumores de la glándula salival ha suscitado un considerable interés. El determinar qué tipo de célula se encuentra involucrada en la inducción de los diferentes tumores ha llevado a diferentes autores a proponer distintas teorías. La primera hipótesis, denominada “teoría semipluripotencial bicelular de la célula de reserva”, fue propuesta por Eversole en 1971 (5) y redefinida por Batsakis y cols (6) seis años más tarde. Batsakis sugirió un “modelo de célula madre pluripotencial bicelular” para explicar la heterogeneidad de las neoplasias de la glándula salival. En este modelo, las células de reserva de los conductos excretores solo originarían los carcinomas escamosos y mucoepidermoides, mientras que las células de reserva de los conductos intercalares serían las responsables de lesiones como el AP y adenoma de células basales, carcinoma adenoide quístico y carcinoma de células acinares. Se asume que la célula acinar, siendo muy diferenciada, es incapaz de dividirse y por ello su papel en la formación de los tumores es mínimo. Los tumores se originarían de una población de células madre presentes en los conductos intercalares y excretores, que son las responsables tanto de la regeneración dentro de la glándula como del desarrollo de metaplasia. A pesar de que la teoría de

origen “bicelular” de los tumores es la más ampliamente aceptada y difundida, no hay evidencia para apoyar esta hipótesis (7). Más bien todo lo contrario, ya que algunos estudios prueban que esta teoría está equivocada (8). De hecho, recientemente se ha demostrado que todos los tipos de células maduras, incluyendo las células basales y acinares, tienen la capacidad de dividirse y proliferar dando lugar a la teoría o “concepto multicelular” en la histogénesis de los tumores. (9,10)

La clasificación de los tumores de la glándula salival esta sencillamente basada en la morfología histológica y se correlaciona con las estructuras normales de la glándula salival. Sin embargo esta similitud histológica no necesariamente implica que un tumor determinado se desarrolle a partir de las estructuras a las que se parece (Fig.4). (10,11)

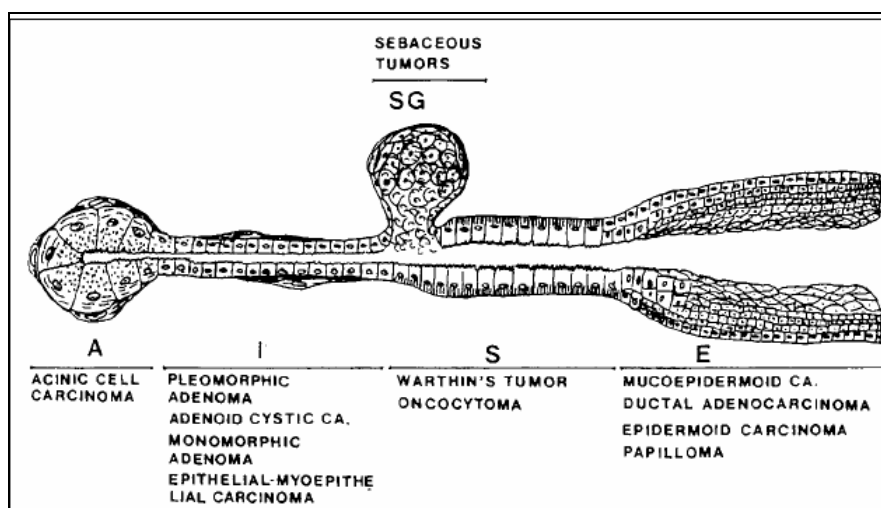


Figura 4. Similitud entre los diferentes tumores y las estructuras epiteliales normales de la glándula salival. (A): Acino, (I): conducto intercalar, (S): conducto estriado, (SG): glándula sebácea, (E): conducto excretor. Fuente: cita (11).

El enfoque actual del problema es más realista, en tanto en cuanto se propone una clasificación de los tumores de la glándula salival, basada en la diferenciación celular más que en la célula de origen (Fig. 5) (10). Analizando el tipo o tipos de células diferenciadas y su organización, así como los productos sintetizados, es posible reordenar la gran variedad de tumores de la glándula salival de una forma más sistemática, con capacidad para mejorar los criterios diagnósticos y hacer una clasificación más funcional. Además, el esquema de la Fig. 5, demuestra cómo la diferenciación celular tumoral influye en la histología, dando lugar a un espectro

histológicamente amplio dentro de un mismo tipo tumoral, y permite que un mismo tumor pueda ser incluido en diferentes categorías, como sucede con el adenoma de células basales o el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado.

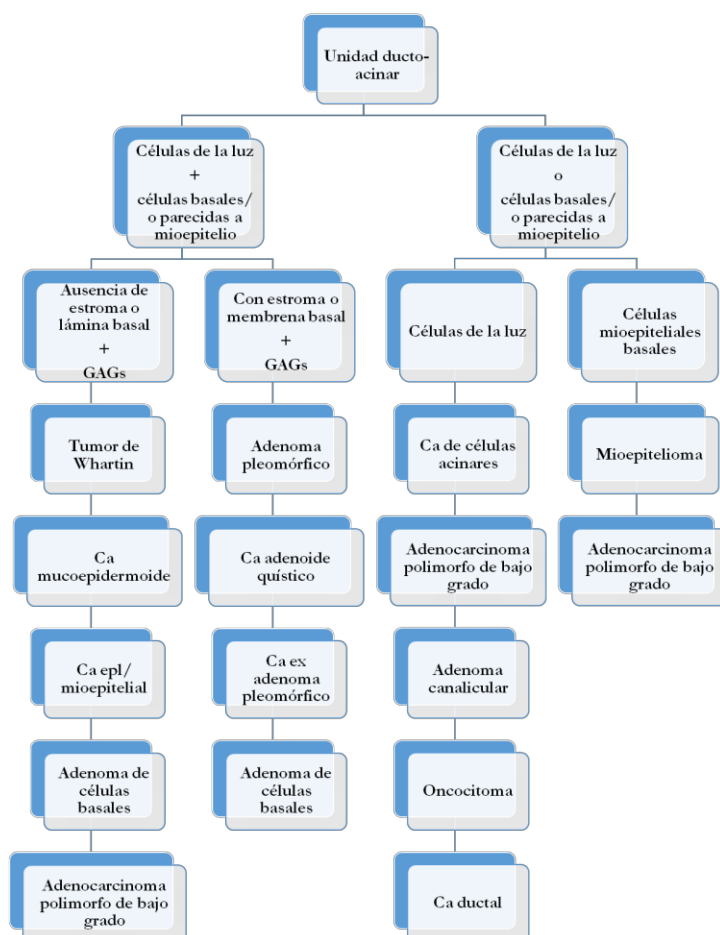


Figura 5. Propuesta de clasificación de los tumores de glándula salival. GAGs: Glucosaminoglicanos. Fuente: cita (10).

Siendo los marcadores tumorales basados en la histogénesis muy necesarios para ayudar en el diagnóstico y en la determinación de la célula de origen de los tumores de la glándula salival, Ohtomo y cols (12) estudiaron la inmunexpresión de SOX10, factor de transcripción crucial en la especificación de la cresta neural y mantenimiento de las células de Schwann y melanocitos, en 76 casos de tumores malignos y en 14 casos de tumores benignos de la glándula salival. La inmunotinción con SOX10 delimitó claramente dos subtipos de tumores: carcinoma de células acinares, CAQ, carcinoma epi-mioepitelial, carcinoma mioepitelial, AP y carcinomas sobre AP que

fueron SOX10 positivos y los carcinomas ductales, mucoepidermoides, carcinomas oncocíticos, oncocitomas y Warthin que fueron SOX10 negativos. Dada la expresión de SOX10 en acinos y conductos intercalares normales, estos resultados sugieren que los tumores SOX10 positivos tienen su origen en estas estructuras (Fig. 6).

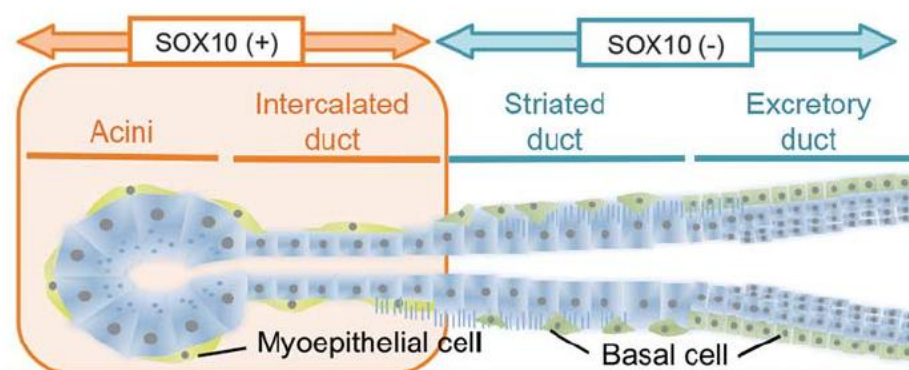


Figura 6. Positividad en acinos y conductos intercalares, negatividad en los conductos estriados y excretores con la proteína SOX10 en una glándula salival normal. Fuente: cita (12).

IMMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS TUMORES DE LA GLÁNDULA SALIVAL

A pesar de que la tinción con la hematoxilina y eosina (H/E) sigue siendo el método “gold standard” para el diagnóstico de los tumores de la glándula salival, la IHQ puede mejorar la precisión diagnóstica y ser una herramienta útil para investigar aspectos del tumor, que no pueden ser valorados en el examen histológico convencional (13). La principal utilidad diagnóstica de la IHC es:

(1) La valoración de la diferenciación celular. El papel más importante de la IHC en el diagnóstico diferencial de los tumores de glándula salival será discriminar si el mioepitelio forma parte del tumor o no. Como marcadores ductales se usan EMA y CEA. La identificación de la diferenciación ductal es necesaria en el diagnóstico diferencial entre el AP y el mioepitelioma y entre el carcinoma epi-mioepitelial y el carcinoma mioepitelial. En cuanto a la diferenciación paraluminal los mejores marcadores del mioepitelio son la calponina y la actina de músculo liso (SMA). Si bien la vimentina y la S100 son marcadores mioepiteliales muy sensibles, en ocasiones también se identifican en las células ductales. En cuanto a la p63 se expresa no sólo en

el mioepitelio, sino también en las células basales y escamosas. La proteína ácida gliofibrilar (PAGF) es poco sensible en la detección del mioepitelio, sin embargo es frecuentemente identificada en el AP y mioepitelioma, y puede ser útil en el diagnóstico diferencial con el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado y el CAQ (14–16). Recientemente se ha descrito que el WT1 es un marcador citoplasmático muy sensible del mioepitelio tumoral en el AP (17). A pesar de que el CD117/c-kit es negativo en la glándula salival normal, es frecuentemente positivo en las células lumbales de varios tipos de tumores de la glándula salival y por ello puede ser utilizado para detectar las glándulas rudimentarias de los mismos (1). En un principio, en los tumores de glándula salival, la positividad para CD117/c-kit se consideró específica para el CAQ. Sin embargo, pronto se comprobó la ausencia de esta especificidad, ya que se ha encontrado en otros tumores (18,19) aunque en un menor porcentaje de casos.

(2) El discriminar entre tumores de histología semejante. Por ejemplo entre tumores con presencia de estructuras cribiformes (adenoma de células basales, CAQ, carcinoma de los conductos y AP). Después de haber separado estos tumores por la presencia o no de mioepitelio (actina de músculo liso, calponina), la evaluación del índice de proliferación, realizando marcaje con Ki67, discrimina el CAQ (con un porcentaje de positividad > o igual al 10%) de un adenoma de células basales (< del 10%).

(3) La evaluación de la malignidad y los factores pronósticos. Además de la inmunoexpresión del Ki 67, la p53 y el HER2/neu entre otros marcadores permiten valorar el grado de malignidad de los tumores añadiendo un valor pronóstico. Un alto índice proliferativo, evaluado con Ki67, se correlaciona con una baja supervivencia en los carcinomas mucoepidermoides, carcinoma de células acinares y CAQ (20). La utilidad de los diferentes marcadores IHQ para evidenciar la diferenciación celular, tanto en la glándula salival normal como en los tumores de glándula salival, se recoge en la tabla 4.

Otros antígenos como el CD43, un marcador de células T e histiocitos, se ha descrito en el CAQ. Así un estudio utilizando el clon L60 encontró un 100% de positividad en este tipo tumoral. Sin embargo en los adenocarcinomas polimorfos de

bajo grado y en los adenomas de células basales, tumores que plantean un diagnóstico diferencial importante, tan solo se observó una positividad del 7% y 12% respectivamente (21). Sin embargo, en otro trabajo sobre CD43 (22), utilizando el clon MT1, solo se detectó en un 48% de los CAQ, pero en ninguno de los otros tipos de tumores estudiados. El CD43 puede tener alguna utilidad en apoyar el diagnóstico de CAQ en casos problemáticos.

La mayor parte de los estudios IHQ publicados en la literatura se han realizado sobre tejido en cortes histológicos y son muy pocos los estudios inmunocitoquímicos (ICQ) efectuados sobre material citológico de PAAF. Uno de los antígenos más utilizados ha sido la PAGF (23,24), habiendo varios estudios que han utilizado biopsias (14,25) y en un caso bloque celular (15). En todos ellos se pone de manifiesto la positividad de la PAGF en el AP, en contraposición a otros tumores de la glándula salival como el CAQ. Recientemente también se han publicado estudios ICQ sobre bloque celular con Myb, (marcador IHQ que representa una sobreexpresión de la proteína MYB, como consecuencia de la traslocación que se produce entre el gen MYB y NFIB) CD117 y PLAG 1 en el diagnóstico diferencial del AP y CAQ. (26,27)

Ac	GS normal	Tumores de GS
AE1/AE3	C. de la luz y paraluminales	Marcador epitelial
EMA	Células de la luz	Marcador ductal
CEA	Célula de la luz	Marcador ductal
SMA	Célula mioepitelial	Marcador mioepitelial. Muy específico
Calponina	Célula mioepitelial	Marcador mioepitelial. Muy específico
P63	Célula mioepitelial y basal	Marcador mioepitelial, basal y escamoso
CK14	Célula mioepitelial y basal	Marcador mioepitelial, basal y escamoso
PAGF	Célula mioepitelial (variable)	Marcador mioepitelial (baja sensibilidad). Muy positivo en el AP y mioepitelioma
Vimentina	Célula mioepitelial	Marcador mioepitelial. Baja especificidad.

Tabla 4. Resumen de la utilidad de algunos marcadores inmunohistoquímicos en los tumores de la glándula salival. GS: glándula salival, AE1/AE3: CK bajo y alto peso molecular, EMA: antígeno epitelial de membrana, CEA: antígeno carcinoembrionario, SMA: actina músculo liso, PAGF: proteína ácida gliofibrilar. Fuente: cita (13).

ESTADIFICACIÓN

El sistema utilizado para la estadificación de los tumores de la glándula salival es el sistema TNM del “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) (28). Este sistema evalúa tres factores: el tumor en sí mismo (T), los ganglios linfáticos alrededor del tumor (N) y si este se ha extendido a otros órganos (M). El sistema TNM diferencia cinco estadios: desde el 0 hasta el IV.

Tumor: la T seguida de una letra o un número del 0 al 4 describe el tamaño y la localización del tumor.

TX: Indica que el tumor primario no puede ser evaluado.

T0: No hay evidencia de tumor primario.

T1: Describe un tumor pequeño, no invasivo, que mide hasta 2 cm en su diámetro máximo.

T2: Describe un tumor mas grande, no invasivo, entre 2 y 4 cm.

T3: Describe un tumor mayor de 4 cm, pero no mayor de 6 cm, que se ha extendido fuera de la glándula salival, pero no afecta al nervio facial o séptimo par craneal.

T4a: El tumor invade la piel, hueso mandibular, canal auditivo, y/o el nervio facial.

T4b: El tumor invade la base del cráneo, o los huesos cercanos, o engloba las arterias.

Ganglio: la N del sistema TNM corresponde a los ganglios.

NX: Indica que los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.

N0: No hay evidencia de cáncer en los ganglios regionales.

N1: Indica que el tumor se ha extendido a un único ganglio linfático, del mismo lado del tumor, y la metástasis mide 3 cm o menos.

N2: Se aplica a cualquiera de estos términos:

N2a: El tumor se ha extendido a un único ganglio linfático, del mismo lado que el tumor primario, y es mayor de 3 cm pero menor de 6 cm.

N2b: El tumor se ha extendido a más de un ganglio linfático, en el mismo lado del tumor, y no miden más de 6 cm.

N2c: El tumor se ha extendido a más de un ganglio linfático, a cualquier lado, y no miden más de 6 cm.

N3: El tumor en las adenopatías es mayor de 6 cm.

Metástasis a distancia: En el sistema TNM la M describe las metástasis.

MX: No pueden evaluarse las metástasis a distancia.

M0: El cáncer no se ha extendido a otras partes del organismo.

M1: El tumor ha metastatizado a otros lugares del organismo.

La estadificación de los tumores se realiza combinando estos tres elementos.

Estadio I: Tumores no invasivos (T1, T2), sin metástasis ganglionares (N0) y sin metástasis a distancia (M0), (Fig. 7).

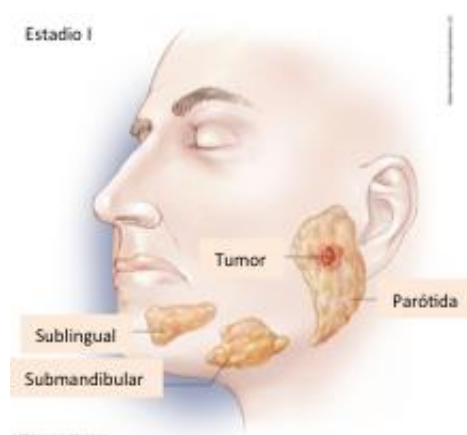


Figura 7. Estadio I. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm.

Estadio II: Tumores invasivos (T3), sin metástasis ganglionares (N0) y sin metástasis a distancia (M0), (Fig. 8).

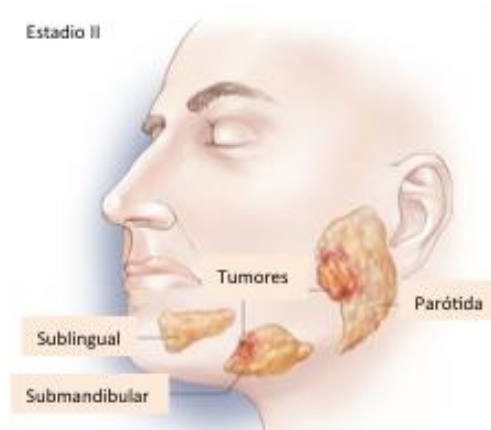


Figura 8. Estadio II. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm.

Estadio III: Tumores pequeños (T1; T2), que han metastatizado a ganglios linfáticos regionales (N1), pero no tienen signos de metástasis a distancia (M0), (Fig. 9).

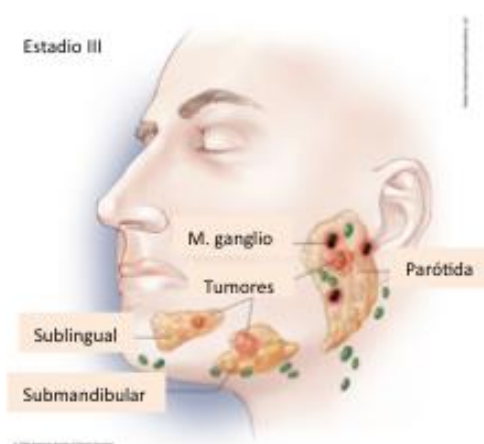


Figura 9. Estadio III. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm.

Estadio IVA: Cualquier tumor invasivo (T4a), bien sin metástasis (N0), o con extensión a una única cadena ganglionar del mismo lado (N1), pero sin metástasis a distancia. También se utiliza para un tumor T3 con afectación ganglionar unilateral (N1), pero sin metástasis, o para cualquier tumor (cualquier T) con afectación ganglionar metastásica extensa (N2), (Fig. 10).

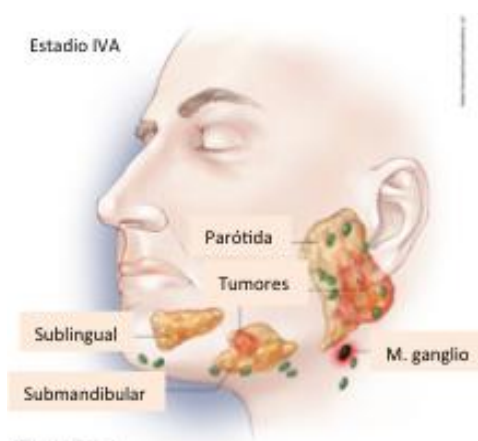


Figura 10. Estadio IVA. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm.

Estadio IVB: Cualquier tumor (cualquier T), con amplia afectación metastásica ganglionar local (N2, N3), pero sin metástasis a distancia (M0), (Fig. 11).

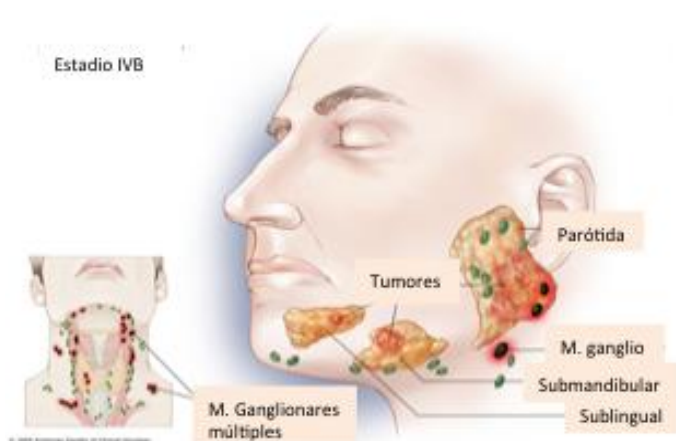


Figura 11. Estadio IVB. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm.

Estadio IVC: Cualquier tumor con metástasis a distancia (cualquier T, cualquier N y M1), (Fig. 12).

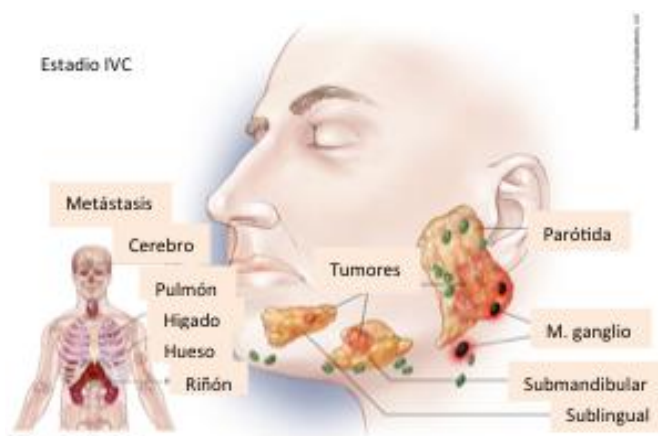


Figura 12. Estadio IVC. Fuente: www.aboutcancer.com/parotid_stages.htm.

PAAF EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS LESIONES DE LA GLÁNDULA SALIVAL

El uso de la aspiración con aguja para fines diagnósticos fue descrita por primera vez por Kun, en 1847, cuando describió “un nuevo instrumento para el diagnóstico de los tumores” (29). Posteriormente fue revisada en 1930 por Hayes E. Martin, cirujano de cabeza y cuello, y Edward B. Ellis, citotécnico jefe en el “Memorial Hospital for Cancer and Allied Diseases”, actual “Memorial Sloan-Kettering Cancer Center” de Nueva York. El éxito de esta nueva técnica se debió en gran parte a Fred W. Stewart, patólogo responsable de la interpretación de los frotis. En 1933, Stewart (30) describió su experiencia en la punción de 2500 tumores y estableció las bases, aun hoy en vigor, para obtener unos buenos resultados.

- (1) Hizo énfasis en la técnica de aspiración y la preparación de los frotis.
- (2) En la importancia de correlacionar la clínica con la interpretación de los frotis.
- (3) El patólogo debía comparar la citología con la histología.
- (4) Una combinación de patrones citológicos y detalles celulares deben de ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los frotis.

(5) También debemos de ser conscientes de las limitaciones del procedimiento.

En Europa, en los años 40 y 60, aparecieron múltiples monografías y artículos sobre el diagnóstico por punción aspiración. Sin embargo, estos no fueron realizados por patólogos sino por hematólogos, como Lopes-Cardozo en Holanda y Soderstrom y Franzen en Suecia. Estos autores preferían la utilización del Giemsa, en contraste con la H/E utilizada en el Memorial, y utilizaron agujas de 22 gauge, en contraposición a los 18 gauge del Memorial. Joseph Zajicek, uno de los primeros patólogos en utilizar la punción aspiración, junto a Sixten Franzen y Torsten Lowhagen en el Radiumhemmet del Hospital Karolinska en Suecia, definieron criterios diagnósticos precisos en una gran variedad de tumores (31). Eneroth y cols (32) describieron en 1966 las características citológicas y su correlación histológica en 368 AP.

En España los primeros patólogos en aplicar la técnica de la PAAF bajo las enseñanzas de Torsten Lowhagen fueron los Dres. Javier Azua en Zaragoza, Pedro de Agustín, del Hospital 12 de Octubre en Madrid, Ricardo Martínez Cabruja del Hospital de la Cruz Roja en Madrid y José M^a. Viguer García Moreno del Hospital Universitario La Paz, también en Madrid.

Actualmente la PAAF es un método diagnóstico muy eficaz en la evaluación de las lesiones de la glándula salival. Ha demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico preoperatorio de los tumores, siendo su alta precisión y rapidez diagnóstica muy beneficiosas en el manejo y planteamiento quirúrgico de la patología tumoral salival (33–38). La PAAF es una técnica segura y bien tolerada por los pacientes. En lo referente al costo, la PAAF ofrece ventajas ya que es una técnica muy económica y que, como se ha comentado, proporciona un diagnóstico rápido y preciso. Además, la decisión de tratar o no a un paciente se puede tomar en base al diagnóstico obtenido tras la PAAF.

Tanto el tratamiento clínico como el quirúrgico de las lesiones de la glándula salival varía enormemente dependiendo de si se trata de lesiones inflamatorias, tumores benignos o tumores malignos, tanto primarios como metastásicos. De tal manera que es necesario e importante, a la hora de plantear el tratamiento oportuno (35,39–42),

tener un diagnóstico previo fiable. En nuestro hospital, la PAAF se está utilizando de forma rutinaria en la evaluación inicial y seguimiento de las lesiones de la glándula salival desde 1980. Si el frotis sugiere un proceso inflamatorio, el paciente es tratado clínicamente y seguido durante un periodo de tiempo, sin necesidad de cirugía. Si se identifica una lesión granulomatosa se pueden realizar estudios microbiológicos, sobre el material de punción, y de esta manera iniciar el tratamiento adecuado cuanto antes. Así mismo, en pacientes con un alto riesgo quirúrgico, la confirmación por PAAF de una lesión benigna podrá diferir el tratamiento del paciente hasta la mejora de su estado clínico. Por último, la PAAF es de gran valor en la identificación de lesiones metastásicas en la glándula salival o en adenopatías intraparotídeas.

Por todo lo anteriormente expuesto, actualmente la PAAF es un método diagnóstico ampliamente difundido, aunque su utilidad clínica sigue siendo cuestionada por algunos autores (43,44). Estas críticas se basan en las complicaciones que puede producir el procedimiento tales como necrosis, hemorragia, proliferación vascular y cambios metaplásicos en las piezas quirúrgicas (43,45–47). Sin embargo, la utilización de agujas finas de 23 y 25G minimiza los riesgos de alterar el tejido (48). Otro de los argumentos, en contra de la utilización de la PAAF como método diagnóstico, es el peligro de siembra tumoral en el trayecto de la aguja o en el sitio de la punción. Sin embargo, no se han encontrado recidivas, ni en la piel, ni en el lugar de la PAAF, en 157 casos de AP de glándula salival mayor tratados quirúrgicamente y seguidos durante un periodo de 10 años. (49)

Un estudio de meta-análisis publicado por Schmidt y cols. en el 2011 (50) muestra una sensibilidad del 96% y especificidad del 98% para el diagnóstico por PAAF de las neoplasias de glándula salival. La distinción entre neoplasias benignas y malignas tiene una sensibilidad del 79% y una especificidad del 96%, debido a que la precisión diagnóstica varía enormemente entre los distintos estudios publicados. Como conclusión los autores expresan que la utilidad de la punción de la glándula salival es altamente dependiente de quién la realiza y la evalúa. Estos autores sugieren que serán necesarios más estudios y, sobre todo, más uniformemente diseñados para valorar realmente la utilidad clínica de la PAAF, en la glándula salival. Según estos mismos

autores (51), en otro meta-análisis, la biopsia con aguja gruesa de la glándula salival aumenta la precisión diagnóstica, pero a un mayor coste. El incremento del coste se refleja en la necesidad de utilización de anestesia, de mayores molestias para los pacientes, y de un mayor número de complicaciones como son el daño neural, los implantes en el trayecto de la aguja y la rotura de la cápsula tumoral. (52,53)

ADENOMA PLEOMÓRFICO

El AP o tumor mixto es el tumor más frecuente de la glándula salival, tanto en niños como en adultos, llegando a constituir hasta el 65% de los tumores de la glándula salival. Aparece en todas las edades siendo más frecuente entre la tercera y sexta década de la vida, con una media de edad a la presentación de 45 años. Es más frecuente en mujeres que en hombres, con una relación de 2:1 (54). La localización más frecuente en las glándulas salivales mayores es la glándula parótida (70-80%), especialmente en la cola del lóbulo superficial. El 10% se localizan en la glándula submandibular y el 10% en la sublingual. La afectación de las glándulas salivales menores representa el 5-10% de los casos, siendo las localizaciones más frecuentes el paladar (sobre todo la unión entre el paladar duro y blando) y el labio. Ocasionalmente puede detectarse esta tumoración en glándulas salivales menores de la nariz, senos paranasales y la laringe.

Aspectos clínicos

El AP se presenta clínicamente como un tumor de crecimiento lento y no doloroso, de varios años de evolución. Los AP del lóbulo profundo de la parótida, pueden presentarse como una masa por detrás de las amígdalas o en el espacio retrofaringeo. Un crecimiento rápido del tumor debe plantear la sospecha de su transformación maligna.

Características macroscópicas

Macroscópicamente el AP es un tumor de consistencia firme, bien delimitado, de color blanquecino a grisáceo y puede medir desde milímetros a varios cm. En el momento de la cirugía la mayoría de los AP son menores de 4 cm (55). Frecuentemente están rodeados por una cápsula de grosor variable (Fig.13 A, B).

Ocasionalmente ésta cápsula, especialmente en tumores mucoides, puede estar parcial o completamente ausente.

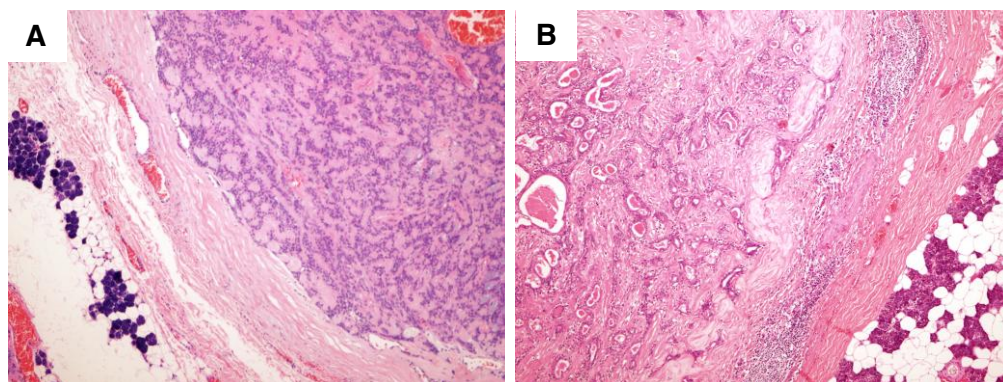


Figura 13. (A) y (B) Cápsula del AP. Clara delimitación del tumor con respecto al parénquima salival normal.

Características microscópicas

Desde un punto de vista histológico, el AP es una neoplasia benigna de la glándula salival con una morfología muy variable debido a la diferente proporción de los componentes epitelial, mioepitelial y estromal, que constituyen la tumoración. Junto con otras neoplasias de la glándula salival comparte una doble diferenciación luminal (Fig. 14 A) y paraluminal (mioepitelial) (Fig. 14 B), pero es el componente estromal el que le da el carácter distintivo.

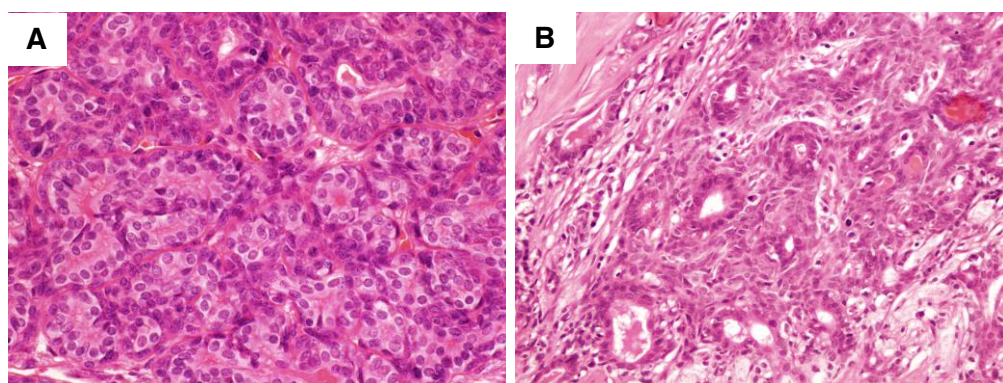


Figura 14. (A) AP con componente epitelial tubular y (B) mioepitelial.

El componente epitelial muestra una gran variedad de células: cuboideas, basaloides, escamosas, fusiformes, plasmocitoides y células claras. Más raramente

pueden verse células mucosas, sebáceas y serosas acinares. El epitelio normalmente forma placas o estructuras parecidas a conductos. Hay un amplio rango de celularidad epitelial y, en ocasiones, el componente epitelial comprende la mayor parte del tumor (AP celular). Este patrón no tiene significado pronóstico. Fueron Foote y Frazell en 1953 (56) los que analizando 250 AP describieron cuatro tipos: (1) principalmente mixoide (36%), (2) componente celular y mixoide en igual proporción (30%), (3) predominantemente celular (22%) y (4) extremadamente celular (12%). Estos autores intentaron correlacionar estos tipos histológicos con el índice de recidivas, estableciendo que el aspecto morfológico no podía determinar el comportamiento clínico.

Los conductos muestran células cubicas y puede reconocerse una capa paraluminal de células mioepiteliales. Las células mioepiteliales pueden ocasionalmente ser morfológicamente semejantes a las lumbinales o pueden presentar citoplasmas claros y núcleos hipercromáticos y angulados. En biopsias pequeñas este patrón plantea el diagnóstico diferencial con tumores malignos como el CAQ y el carcinoma epi-mioepitelial. Los conductos contienen frecuentemente un material eosinófilo de secreción (Fig. 15 A) y en ocasiones se distienden, hasta formar pequeños quistes. Puede identificarse metaplasia escamosa, (Fig. 15 B), que a veces da lugar a la formación de perlas corneas, así como metaplasia mucosa o aclaramiento citoplasmático. Estos cambios plantean el diagnóstico diferencial con un carcinoma mucoepidermoide. Menos frecuentemente se ven células sebáceas (Fig. 16 A) o células serosas con gránulos de zimógeno. Otra característica poco frecuente es la presencia de células epiteliales multinucleadas.

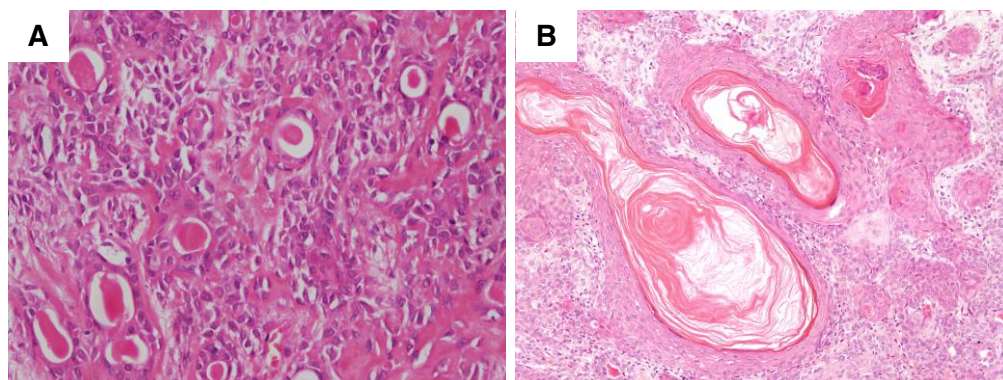


Figura 15. (A) AP con material de secreción eosinófila. (B) Metaplasia escamosa en AP.

Las células mioepiteliales pueden formar una fina retícula o placas de células fusiformes. Estas últimas, ocasionalmente se disponen en empalizada de forma semejante a la apariencia de un schwannoma (Fig. 16 B). Otro aspecto muy característico se produce cuando las células mioepiteliales adoptan una apariencia plasmocitoide (Fig. 17 A) o hialina (Fig. 17 B). Un cambio infrecuente, que generalmente es focal, es la presencia de oncocitos. Si estos cambios son difusos pueden plantear el diagnóstico erróneo de oncocitoma. La presencia de cristales en forma de cristaloides de colágeno y cristales de tiroxina y oxalato son otros hallazgos poco frecuentes.

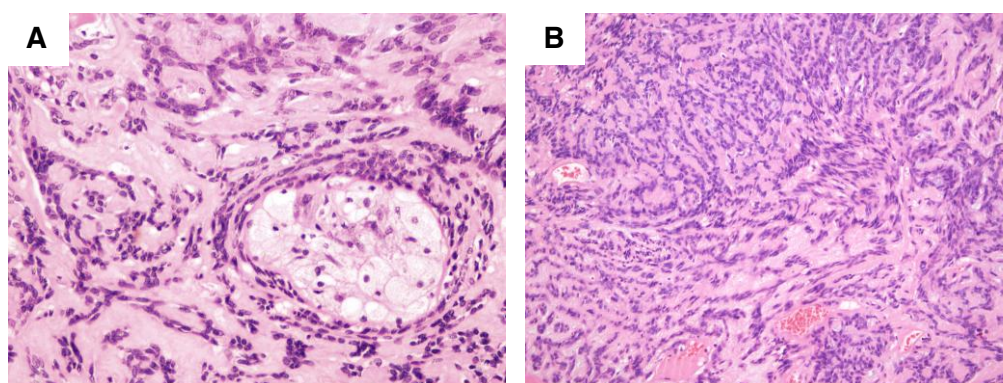


Figura 16. (A) AP con células sebáceas. (B) AP con apariencia de schwannoma.

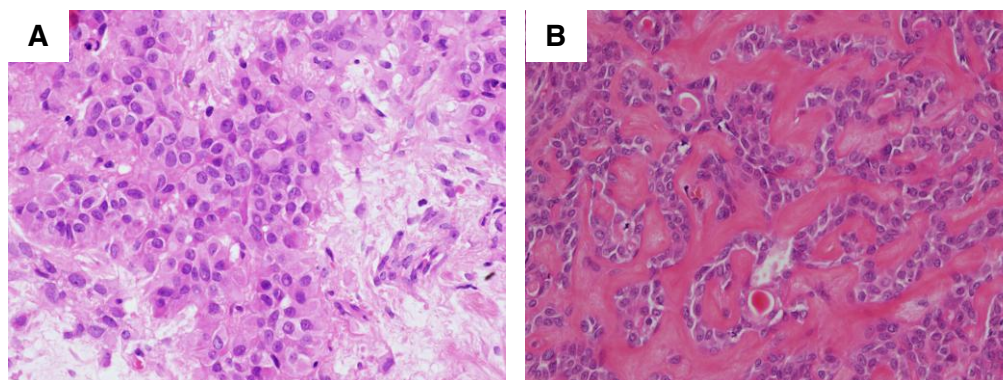


Figura 17. (A) AP con hábito plasmocitoide. (B) AP con hialinización de las células mioepiteliales.

Las células inmersas en el estroma mixoide son de origen mioepitelial. Tanto el componente parecido al cartílago, como el parecido al hueso, son auténticos cartílago y hueso. El depósito de un material eosinófilo homogéneo y hialino entre las células tumorales y en el estroma es un hecho llamativo en algunos AP. Este material forma masas globulosas o placas y típicamente es positivo con la elastina, adopta una apariencia cribiforme o cilindromatosa, que remeda al CAQ (Fig. 18 A y B). Algunos tumores de larga evolución muestran un aumento de la hialinización con desaparición progresiva del componente epitelial. El componente parecido al mesénquima es mucoide/mixoide, cartilaginoso (Fig. 19 A) o hialinizado (Fig. 17 B) y, en ocasiones, puede representar la mayor parte del tumor. Ocasionalmente los tumores presentan degeneración quística con las células neoplásicas formando un anillo alrededor de una cavidad central (Fig. 19 B).

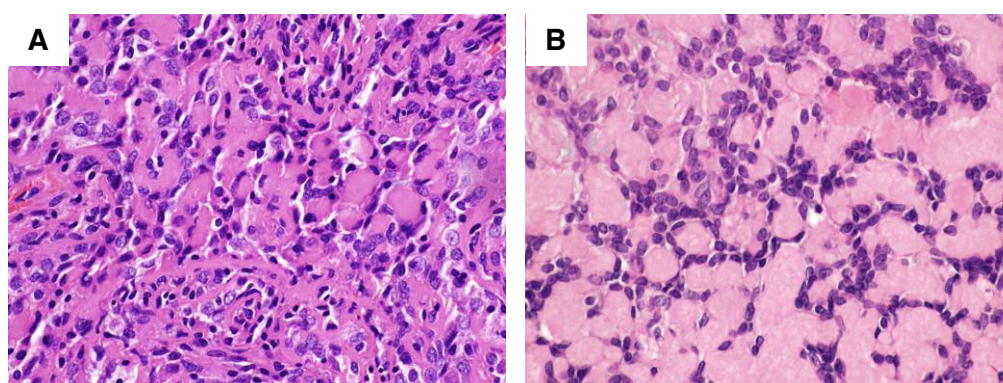


Figura 18. (A) y (B) AP con patrón cilindromatoso.

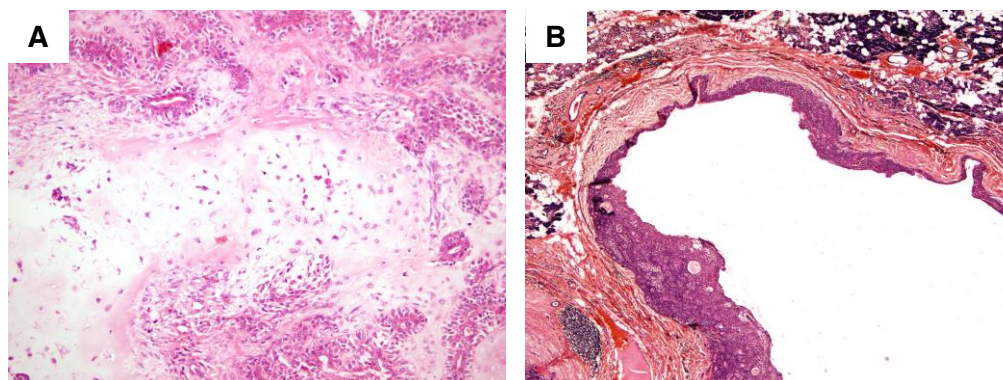


Figura 19. (A) AP con diferenciación condroide. (B) AP con transformación quística.

Punción Aspiración con Aguja Fina

El aspecto clínico del AP es de gran ayuda para el patólogo que realiza la punción. Se trata en general de un tumor pequeño de localización preauricular o en cola de parótida, que se desplaza sobre la piel, y es de consistencia firme a diferencia de otros tumores benignos de glándula salival. El aspecto macroscópico del frotis es característico, tanto en la forma como se extiende el material debido a su textura, como en la apariencia del mismo, observándose un aspecto mucoide, gelatinoso o grumoso. A pesar de su gran diversidad histológica, el diagnóstico citológico del AP es fácil, en la mayoría de los casos, debido a su imagen característica: la combinación de un componente epitelial/mioepitelial, citológicamente benigno, y fragmentos de estroma condromixoide (Fig. 20 A y B) con células fusiformes inmersas en él (Fig. 21 A, B).

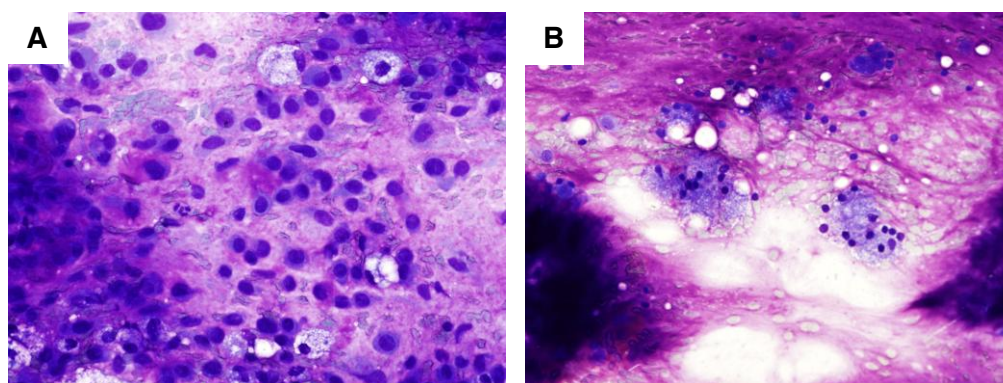


Figura 20. (A) PAAF de AP con predominio de células plasmocitoides. (B) AP de predominio mixocondroide.

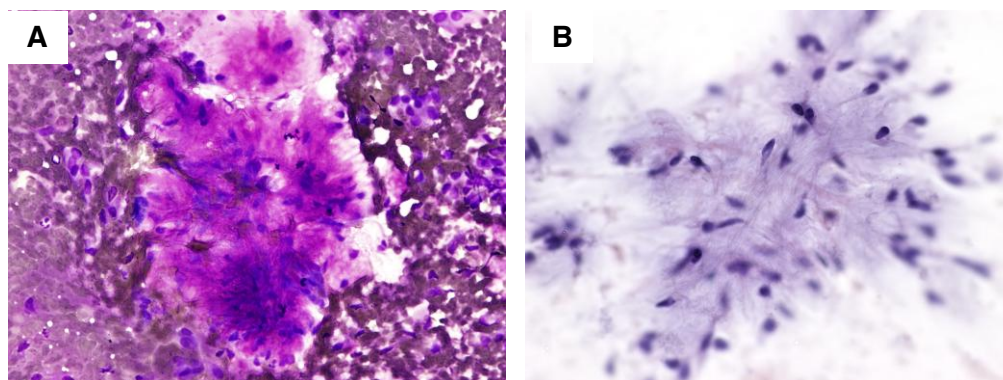


Figura 21. (A) PAAF de AP teñida con Diff-Quik. Estroma característico en rayos de sol. (B) AP teñido con Papanicolaou en donde se identifican mejor los detalles celulares.

La matriz mesenquimal mixoide del AP se tiñe débilmente con el Papanicolaou de un color grisáceo claro siendo mucho más evidente en los frotis teñidos con Diff-Quik. Esta matriz adopta frecuentemente una disposición radial, y un aspecto fibrilar, semejando a la imagen que producen los rayos de sol (Fig. 21 A). La proporción entre estroma y células (epitelio/mioepitelio) es variable, pudiéndose producir problemas diagnósticos cuando predomina uno de los dos componentes. Por ejemplo, el predominio del estroma mixoide puede ser confundido con moco o contenido quístico. Por el contrario, los AP celulares, donde predomina el componente celular (epitelio/mioepitelio), pueden plantear problemas de diagnóstico diferencial con los adenomas de células basales y con el CAQ (57). En la serie publicada por Viguer y cols. (58) destacan la existencia de variantes morfológicas que pueden provocar errores diagnósticos como son: la atipia en el 20,6% de los casos, la presentación quística en el 7% y el patrón cilindromatoso con la presencia de glóbulos metacromáticos en el 5%, que remeda al CAQ. Estas variaciones del patrón citológico convencional pueden dar lugar a un diagnóstico citológico erróneo, con el resultado de un tratamiento quirúrgico no adecuado.

Es indudable que el AP contiene tanto células epiteliales como mioepiteliales, ahora bien ¿es posible morfológicamente en una PAAF diferenciarlas o incluso sirve para algo?. Kawahara y cols. (59) hicieron un estudio de 20 AP sobre material de impronta con marcadores inmunohistoquímicos, para intentar diferenciar las células epiteliales de las mioepiteliales. Llegaron a la conclusión de que el componente epitelial

es muy variable en los AP pudiendo en algunos casos no ser identificado en la citología y que el poder de definición del AP está en el componente de células mioepiteliales en sus distintas formas (plasmocitoide, fusiforme y estrellada). Hay autores (60) que admiten que si las células epiteliales se disponen sueltas son indistinguibles de las mioepiteliales. Sin embargo otros mantienen la diferencia entre ambos componentes celulares.

Inmunohistoquímica

En el AP, las células ductales internas de las estructuras tubuloglandulares son positivas para las queratinas 3, 6, 10, 11, 13 y 16 (2,61) y también para las queratinas 7, 8, 18, 19 y 20 (62). Las células mioepiteliales/basales neoplásicas son positivas para panqueratinas, CK 5/6, CK34βE12 y CK14 (61). También expresan vimentina (61), S100 (13), actina de musculo liso y muscular específica (63), PAGF (15,25), calponina (63), CD10 (1) y maspina (1). Más recientemente también se ha referido la positividad para podoplanina (64). Actualmente se suelen considerar como marcadores más fiables para las células mioepiteliales neoplásicas la p63 (13), la maspina (1) y la calponina (13). Sin embargo, la p63 también marca las células basales (65). La PAGF tiene generalmente una baja sensibilidad como marcador mioepitelial, sin embargo es frecuentemente detectado en el AP (14,15,23,24). Este hecho puede ser muy útil en el diagnóstico diferencial con el CAQ y el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado, en los que la PAGF es negativa. (14–16)

Recientemente, Langman y cols. (17) evaluaron la inmunoreactividad del WT1 en el AP y concluyeron que este marcador es el de mayor utilidad para la identificación del mioepitelio en este tumor; siendo superior a la calponina y p63. También, en los últimos años, se han realizado varios estudios inmunohistoquímicos con PLAG1 (66–69) mostrando positividad nuclear tanto en el AP como en los carcinomas sobre AP y no en otros tipos de carcinomas de la glándula salival. Estos autores sugieren que el PLAG1, independientemente de su reordenamiento molecular, puede ser muy útil en el diagnóstico del AP y de los carcinomas sobre AP.

Las células no lacunares de las áreas condroides son positivas para vimentina y panqueratinas, mientras que las lacunares son solo positivas para vimentina. El mioepitelio neoplásico fusiforme, que rodea a las áreas condroides, expresa la proteína morfogenética ósea (BMP); mientras que las células ductales y las células lacunares en las áreas condroides expresan BMP-6. En la matriz condroide se encuentran la condromodulina1 y el colágeno tipo II. (2)

Tratamiento

No es prudente pretender establecer el diagnóstico de AP basándose exclusivamente en criterios clínicos, ya que muchos de los tumores tanto benignos como malignos de parótida se presentan con el mismo cuadro clínico y están bien delimitados a la exploración. Además del 50 al 75% de los carcinomas de parótida son asintomáticos y están bien delimitados. Estos datos clínicos son superponibles a los del AP. (70)

Las opciones de tratamiento quirúrgico de los tumores en la glándula parótida son:

Parotidectomía superficial (PS) conservadora que consiste en la exéresis del lóbulo superficial glandular conservando el nervio facial, mediante disección de sus ramas y el lóbulo profundo (Fig. 22).

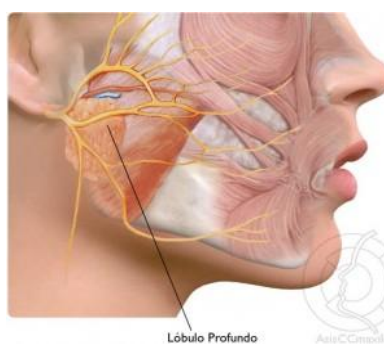


Figura 22. Parotidectomía superficial. Fuente: www.asisccmaxilo.com

Parotidectomía total (PT) conservadora, incluye la exéresis de toda la glándula, lóbulo superficial y profundo, conservando el nervio (Fig. 23).

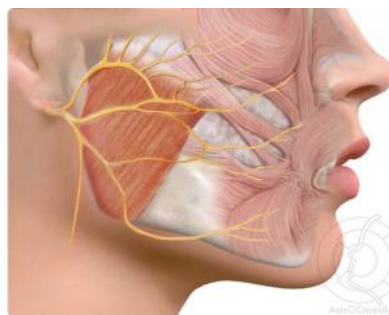


Figura 23. Parotidectomía total. Fuente:www.asiscmaxilo.com

Parotidectomía radical, es la resección de la glándula en bloque incluyendo el nervio, que discurre entre el lóbulo superficial y profundo (Fig. 24).



Figura 24. Parotidectomía radical con extirpación del lóbulo superficial y profundo de la parótida derecha, incluyendo el nervio facial. Tronco del nervio facial a la salida del agujero estilomastoideo.

Parotidectomía ampliada, que añade a la radical la extirpación de estructuras adyacentes que puedan estar afectadas por el tumor (músculo masetero, piel, rama ascendente de mandíbula etc.).

Vaciamiento ganglionar cervical asociado a las opciones previas. En determinados tumores malignos, puede ser necesario asociar vaciamiento ganglionar electivo (si no hay evidencia en las pruebas de imagen de ganglios afectados) o terapéutico (cuando existen ganglios positivos).

Injertos nerviosos y/o técnicas de rehabilitación facial. Cuando hay que sacrificar el nervio facial por infiltración tumoral o por margen quirúrgico de resección debe realizarse, siempre que sea posible, la reconstrucción del nervio, puenteando el defecto generado con injerto de nervios (Fig. 25).

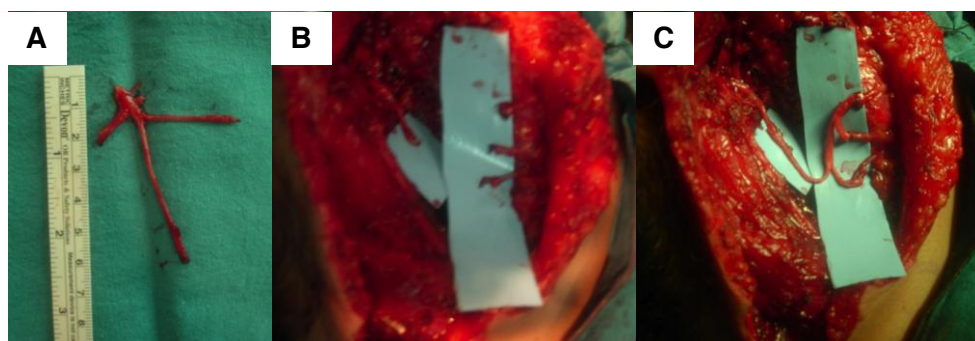


Figura 25. (A) Injerto de nervio auricular contralateral (lado izquierdo) con tres ramas. (B) Defecto del nervio facial extirpado entre el tronco y las ramas terminales. (C) Puenteado del defecto con el injerto del nervio auricular con suturas microquirúrgicas epineurales.

El tratamiento quirúrgico del AP de la parótida ha sido discutido durante los últimos 100 años (70). Los tipos de tratamientos utilizados han sido: enucleación, PS, PT y radical con o sin vaciamiento ganglionar. La enucleación era la técnica más ampliamente utilizada hasta hace unos años en que se dejó de utilizar por la alta incidencia de recidivas. En el momento actual sigue existiendo controversia entre los que abogan por una parotidectomía formal: (PS) o (PT) (Fig. 22 y 23), y otros que defienden una cirugía más limitada, como la parotidectomía parcial superficial (PPS) o la disección extracapsular (DEC) (Fig. 26).

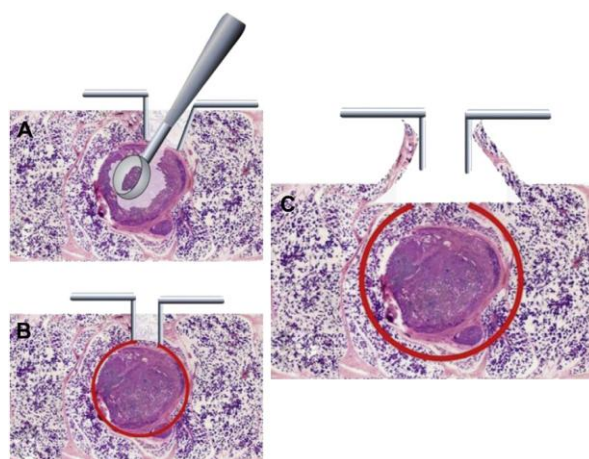


Figura 26. (A) Enucleación intracapsular. (B) Enucleación extracapsular. (C) Disección extracapsular (DEC). Fuente: cita (70).

Si se acepta la PS como la cirugía mínima para un tumor pequeño y nodular, no parece muy necesario el establecer un diagnóstico preoperatorio sobre si el tumor es benigno o maligno. En este contexto, el valor o la utilidad clínica de la PAAF puede ser

discutida (43). Sin embargo, la necesidad de un diagnóstico preoperatorio para establecer la benignidad o malignidad de un tumor pequeño y móvil se hace obvia si se considera una cirugía más limitada como puede ser una DEC o una PPS (70,71). Los AP localizados en la cola de la parótida (Fig. 27) son fácilmente accesibles con cirugía limitada (72). El riesgo de una parálisis facial permanente, síndrome de Frey, (síndrome del nervio auriculotemporal o de la sudoración gustativa, que se caracteriza por la aparición de eritema y sudoración en la piel de la cara, normalmente en la región preauricular y en relación con la masticación y deglución, que es muy incómodo para el paciente), o problemas cosméticos es inferior para la PPS y DEC que en la parotidectomía formal. La utilización preoperatoria de la PAAF es necesaria para evitar una cirugía inapropiada, por excesivamente limitada, en las neoplasias malignas (70). Como conclusión Zbären y cols (70) abogan por una PPS como tratamiento de los AP móviles y de pequeño tamaño ya que, al ser una cirugía con un margen mayor de tejido sano que la DEC, puede minimizar el riesgo de recidivas. De hecho, las recidivas después de una PPS o DEC no son superiores a las recidivas producidas después de una parotidectomía formal.

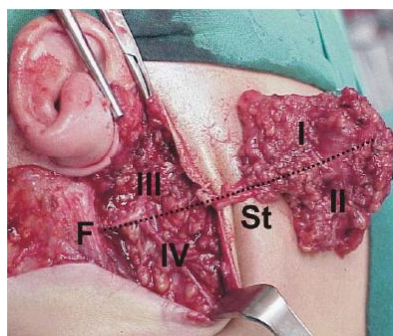


Figura 27. Denominación de la parotidectomía dependiendo de la amplitud de la resección. I: lateral parcial craneal, II: lateral parcial caudal, denominada cola de parótida, III y IV: profunda craneal y caudal, F: nervio facial, St: conducto de Stenon. Fuente: cita (72).

Las Fig. 28 y 29 muestran los porcentajes de las complicaciones de las distintas cirugías realizadas en tumores benignos de la glándula salival, en relación con la extensión de la misma. (73)

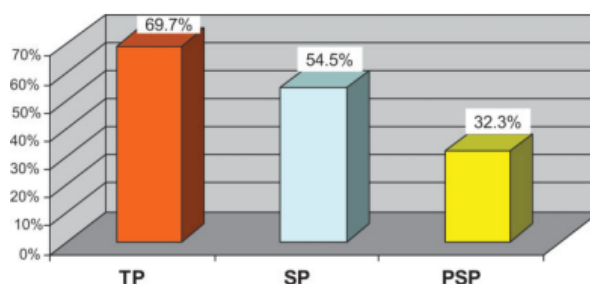


Figura 28. Incidencia del síndrome de Frey en relación a la extensión de la cirugía. TP: parotidectomía total, SP: parotidectomía superficial, PSP: parotidectomía parcial superficial. Fuente: cita (73).

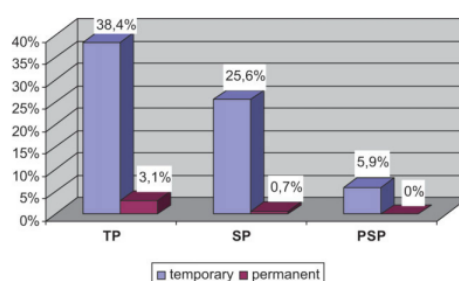


Figura 29. Incidencia de parálisis facial temporal y permanente en relación a la extensión de la cirugía. TP: parotidectomía total, SP: parotidectomía superficial, PSP: parotidectomía parcial superficial. Fuente: cita (73).

Según un estudio de revisión sistemática con meta-análisis llevado a cabo por Albergotti y cols. (74) sobre la DEC y la PS, no se han identificado diferencias en el número de recidivas o de las parálisis permanentes del nervio facial, siempre que se aplique este tipo de cirugía a nódulos únicos, clínicamente benignos de la glándula parótida. Sin embargo, Witt y cols. (75) han identificado un mayor porcentaje de recidivas y disfunción permanente del facial con la DEC que con la PPS. La DEC parece que tiene una menor incidencia de parálisis facial transitoria y de Síndrome de Frey. Por lo tanto, la DEC ha de ser considerada una opción quirúrgica para neoplasias benignas salivales seleccionadas (74,76). Zäbaren (70) aboga más por la PPS (con disección del nervio facial y 2 cm de margen de parénquima parotídeo) que por la DEC, alegando que con la DEC en manos inexpertas puede producirse un alto porcentaje de recidivas. Concluye su estudio proponiendo la realización de estudios prospectivos multicéntricos amplios que permitan decidir cuál es el mejor

tratamiento para el AP. Recientemente dos autores, Barzan y cols. y Cristofaro y cols., abogan por los beneficios de la DEC. (77,78).

En nuestro medio de trabajo se considera fundamental establecer el diagnóstico previo a la cirugía mediante la PAAF de una tumoración parotídea para plantear el más adecuado enfoque quirúrgico, tanto desde el punto de vista resectivo como reconstructivo, permitiendo preservar estructuras importantes como puedan ser el SMAS (sistema músculo aponeurótico superficial) y nervio facial. La preservación del SMAS reduce la incidencia del síndrome de Frey. El saber la naturaleza del tumor, con anterioridad a la cirugía, permite además planificar la actitud a seguir con el nervio facial, cuando este está muy próximo o involucrado en la tumoración. Según el tipo de tumor se puede intentar despegarlo de la tumoración, conservándolo o sacrificándolo y estar preparado y el paciente avisado, por si hubiera que reconstruirlo.

Genética molecular

En los últimos años se han descrito traslocaciones cromosómicas específicas en el AP, carcinoma mucoepidermoide y CAQ. En aproximadamente el 70% de los AP pueden identificarse aberraciones cromosómicas con alguno de estos patrones: reordenamiento de 8q12 (39% de los casos), de 12q13-15 (8% de los casos) o bien cambios clónicos esporádicos que no afectan a estos loci (23% de los casos) (2,79). El gen diana del cromosoma 12q13-15 es HMGA2 (previamente conocido como HMGIC), que codifica una proteína de unión a cromatina. Los genes asociados son FHIT (histidina frágil triada gen) en t(3;12)(p14.2;q145) y NFIB (proteína nuclear que participa en la regulación transcripcional) en (9;12)(p23;q12q15). El gen fusionado resulta en una desregulación de la expresión de HMGA2.

El gen diana del cromosoma 8 es PLAG1, que codifica un factor de transcripción con morfología en dedo de zinc. Cuando se producen los reordenamientos este gen se fusiona con CTNNB1 (β -catenina) en el cromosoma 3 o con LIFR (factor receptor inhibidor de la leucemia) en el cromosoma 8. La sobreexpresión del PLAG1 también puede suceder por reordenamientos crípticos intracromosómicos 8q, dando lugar a las fusiones CHCHD7-PLAG1 o TCEA1-PLAG1. Se precisan más estudios para explorar

el valor potencial de estas traslocaciones en el diagnóstico de estos dos tipos de tumores.

Aström y cols. (80) estudiaron la expresión del PLAG1 mediante “Northern blot” en 47 tumores benignos y malignos de distintas localizaciones, con o sin aberraciones genéticas de 8q12. Se observó expresión del PLAG1 en 23 tumores (49%). 13 de 17 AP con cariotipo normal y 5 de los 10 con aberración 12q13-15 mostraron sobreexpresión PLAG1, lo que demuestra que la activación del PLAG1 es frecuente en los AP independientemente del cariotipo. Sin embargo, solo 2 de los 11 tumores malignos de glándula salival mostraron sobreexpresión de PLAG1. Esto demuestra que, al menos en los tumores de glándula salival, la activación PLAG1 ocurre preferentemente en tumores benignos. Como conclusión demuestran que PLAG1 se activa, no solo en AP con la aberración 8q12, sino también en tumores con cariotipo normal y aberración 12q13-15, así como en aislados casos de tumores malignos de glándula salival. Sugieren otros mecanismos de activación de PLAG1, con o sin la aberración 8q12.

El PLAG1 es un proto-oncogen localizado en el cromosoma 8q12 y activado en los AP de la glándula salival (79,80), lipoblastomas (81), hepatoblastoma (82), leucemia linfocítica crónica (83), tumor del estroma intestinal pediátrico (84), leiomioma sarcoma (80) y leiomioma uterino (80). La mayor parte de los autores consideran que el CAQ no expresa PLAG1, aunque Aström y cols (80) describen dos casos de carcinomas de glándula salival que mostraron sobreexpresión del PLAG1: uno fue un carcinoma sobre AP y el otro caso un CAQ. Los autores no excluyen la posibilidad de que este último caso sea un carcinoma sobre AP, pues es conocido que los CAQ pueden desarrollarse sobre AP. Varias fusiones de genes específicos de tumores pueden identificarse con técnicas de IHQ. La activación trascripcional del PLAG1 también puede identificarse mediante el anticuerpo contra la proteína PLAG1 y esto puede complementar el diagnóstico de este tipo de tumores. (85)

Debiec-Rychter y cols. (86) describen la localización inmunohistoquímica de la proteína PLAG1 y lo relacionan con las áreas positivas para CK, vimentina y BCL-2. Así mismo, también demuestran que el PLAG1 fue negativo en la glándula salival

normal. En los AP se identificaron células intensamente reactivas para PLAG1 en las capas exteriores a las estructuras túbulo-ductales, que resultaron discretamente positivas para CK, y que se piensa que son el origen de células con fenotipo bidireccional epitelio/ mesénquima. En contraste, las células epiteliales con marcada tinción para CK, correspondientes a las estructuras internas túbulo-ductales, solo mostraron PLAG1 esporádicamente. Los AP sin reordenamiento del gen PLAG1 no mostraron inmunoreactividad por inmunofluorescencia, a diferencia de lo que ocurre en los casos de Matsuyama y cols (66). Estos autores estudiaron la inmuoexpresión del PLAG1 en 45 AP y otros 46 casos correspondientes a otros tumores de la glándula salival. Todos los AP expresaron PLAG1, sin embargo solo 12 de los 45 mostraron transcritos de fusión que implicaban a PLAG1 y HMG2, identificados mediante RT-PCR. De los otros tumores, correspondientes a carcinoma sobre AP, solo 4 fueron positivos para PLAG1. Los dos casos de adenomas de células basales estudiados resultaron negativos para el PLAG1 y para la traslocación PLAG y HMGA, indicando que los adenomas de células basales y el AP son dos entidades distintas con mecanismos moleculares diferentes. Sin embargo, no ocurre lo mismo con el mioepitelioma en él que se ha detectado una alteración en el 12q similar a la de los AP. Los casos positivos de AP lo fueron independientemente del tipo de reordenamiento del PLAG1. Estos resultados indican que la detección del PLAG1 mediante inmunohistoquímica puede ser útil desde un punto de vista diagnóstico, aunque el mecanismo mediador para la sobreexpresión del PLAG1 puede ser variable. Rotellini (68) examinó un total de 101 casos de tumores de glándula salival, siendo el PLAG1 difusamente positivo en el 94% de los AP y en 8 mioepiteliomas, aunque con menor intensidad. Fueron negativos los 3 casos de adenomas de células basales. En lo que respecta a los carcinomas fueron positivos 2 adenocarcinomas polimorfos de bajo grado y 1 de carcinoma sobre AP. Concluyen los autores que el PLAG1 es un buen marcador con una buena especificidad para el AP y puede contribuir al diagnóstico del mismo. Esta misma idea es recogida y expresada por Pusztaszeri y cols. (87)

Resumen

En resumen el motivo de este trabajo es poner de manifiesto las ventajas de la PAAF en el diagnóstico del AP, no solo desde un punto de vista práctico, ya que en la inmensa mayoría de los casos el diagnóstico morfológico está claro, sino de la experiencia que nos da la práctica diaria de la punción, que permite ayudarnos, en los casos en donde la atipia, la transformación quística o la presencia de un patrón cilindromatoso, dificultan el diagnóstico. Así mismo, es importante la identificación de los AP desde un punto de vista quirúrgico ya que cada vez hay mayor tendencia a no sobre tratar a los pacientes, sobre todo en casos de AP pequeños y localizados en el lóbulo superficial de la parótida. Se valoran cada vez más los tratamientos quirúrgicos poco agresivos, como la DEC o la PPS, que no conllevan un aumento del número de recidivas y sí un menor número de complicaciones tanto estéticas como post-quirúrgicas.

En lo que respecta a la IHQ, si bien la biopsia con H/E sigue siendo el “gold estándar” de la punción y el mejor método diagnóstico, existen algunos anticuerpos como la PAGF que específicamente se expresan en el AP y no en el CAQ ni en el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado, tumores con los que el diagnóstico diferencial puede ser difícil. El WT1 si bien no ha sido probado en otros tumores de la glándula salival, si es un gran marcador de la célula mioepitelial en el AP.

Y por último el PLAG1, que es un protooncogen que se activa por reordenamientos cromosómicos en el AP, también es un buen marcador del mismo, siendo ligeramente positivo en mioepiteliomas y en casos de carcinomas sobre AP.

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

La PAAF es útil en el diagnóstico preoperatorio del AP y ayuda en la toma de decisiones terapéuticas.

Un mayor conocimiento de las variantes morfológicas conllevaría una disminución en el número de errores diagnósticos citológicos.

Los nuevos marcadores IHQ podrían jugar un papel relevante en el diagnóstico del AP.

2. OBJETIVOS

- 1º Establecer el valor de la PAAF en el diagnóstico del adenoma pleomórfico.
- 2º Determinar las causas responsables de los errores diagnósticos, intentando reconocer variantes citológicas poco frecuentes.
- 3º Valorar si la experiencia del citopatólogo en el diagnóstico del adenoma pleomórfico resulta en un menor número de errores diagnósticos.
- 4º Determinar el valor de la inmunohistoquímica en la diferenciación de los distintos tipos de células mioepiteliales en biopsias de AP.
- 5º Comparar la immunoexpresión con técnicas de inmunocitoquímica de distintos marcadores epiteliales (CK19) y mioepiteliales (calponina, PAGF WT1 y PLAG1) en el material de PAAF del AP.

III MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Hemos realizado un total de 2.349 PAAF de glándula salival recogidas en este trabajo desde 1980 hasta el año 2011 inclusive. Para su estudio se han dividido en tres periodos (1980-1994, 1985-2003 y 2004-2011). Del total de 2.349 PAAF de glándula salival, hemos estudiado las características morfológicas de aquellas PAAF con diagnóstico citológico e histológico de AP, que corresponden a 633 pacientes, divididos en tres grupos:

Grupo 1

Corresponde al estudio de 212 pacientes durante el periodo 1980-1994. De estos se dispone de biopsias en 184 casos. Además hemos estudiado las biopsias con diagnóstico de AP en otros 14 pacientes con otro diagnóstico citológico, diferente al de AP, haciendo un total de 198 biopsias. Las características de los mismos se describen en el apartado 1 de los resultados.

Grupo 2

Corresponde al estudio comparativo entre el primer periodo (1980-1994) y un segundo periodo (1995-2003), con un total de 244 pacientes. De estos se dispone de biopsias en 220 casos. Además hemos estudiado las biopsias con diagnóstico de AP en otros 10 pacientes con otro diagnóstico citológico, diferente al de AP, sumando un total de 230 biopsias. Las características de los mismos se describen en el apartado 2 de los resultados.

Grupo 3

Corresponde al estudio de 221 pacientes con PAAF durante el periodo 2004-2011. De éstos se dispone de biopsias en 194 casos. Además también hemos estudiado las biopsias con el diagnóstico de AP en otros 11 pacientes con otro diagnóstico citológico, diferente al de AP, haciendo un total de 205 biopsias.

De los 221 pacientes 76 fueron varones y 145 mujeres. Las localizaciones fueron: parótida: 169; submandibular: 26; paladar: 17; mejilla: 5; espacio parafaríngeo: 2 y labio: 2.

Además, con posterioridad estudiamos otros 40 pacientes con PAAF y biopsia de AP de glándula salival. En ellos se efectuaron estudios de IHQ e ICQ. La edad, género, localización y diagnóstico quedan reflejados en la Tabla 5.

Nº DE CASO	EDAD(años)	GÉNERO	LOCALIZACION	DX. PAAF
1	36	F	PARÓTIDA (RECIDIVA)	AP
2	54	M	PARÓTIDA	AP
3	53	F	PARÓTIDA	AP
4	39	F	PARÓTIDA	AP
5	54	F	PARÓTIDA	AP
6	56	F	PARÓTIDA	AP
7	40	M	PARÓTIDA	AP
8	33	F	PARÓTIDA	AP
9	39	F	PALADAR	AP
10	14	M	SUBMAXILAR	AP
11	55	F	PARÓTIDA	AP
12	17	M	PARÓTIDA	AP
13	26	F	SUBMAXILAR	AP
14	47	F	PARÓTIDA	AP
15	57	M	PARÓTIDA	AP
16	13	F	SUBMAXILAR	AP
17	51	F	PARÓTIDA	AP
18	60	F	PARÓTIDA	AP
19	40	F	PARÓTIDA	AP
20	67	F	PARÓTIDA	AP
21	50	M	SUBMAXILAR	FAMILIA AP
22	20	F	PARÓTIDA	AP
23	72	M	PARÓTIDA	AP
24	29	F	PARÓTIDA	AP
25	52	M	PARÓTIDA	AP
26	34	F	PARÓTIDA	AP
27	49	F	PARAFARINGEA (TAC)	AP
28	70	M	SUBMAXILAR	AP
29	44	F	PARÓTIDA	AP
30	57	F	PARÓTIDA	AP
31	32	F	PARÓTIDA	AP
32	67	M	PARÓTIDA	AP
33	28	F	PARÓTIDA	AP
34	63	F	PARÓTIDA	AP
35	48	F	PARÓTIDA (RECIDIVA)	AP
36	23	F	PAROTIDA	AP
37	23	M	SUBMAXILAR	AP
38	47	M	PARÓTIDA	AP
39	46	F	PARÓTIDA	AP
40	63	M	PARÓTIDA	AP

Tabla 5. Edad, género, localización y diagnóstico por PAAF de los 40 casos de AP estudiados con técnicas de inmunohisto-citoquímica. F: femenino, M: masculino.

MÉTODOS

Estudio citológico

El método de obtención de la muestra citológica y preparación de la misma ha sido el mismo desde que se inició la realización de la PAAF en 1979.

Obtención de las muestras

Se realiza la punción aspiración del nódulo tumoral con las siguientes características:

Se emplean agujas finas de 23 o 25 gauge con una longitud de 2,5 y 1,5 cm respectivamente. En raras ocasiones, en tumoraciones profundas habrá que utilizar agujas de 25G más largas de 4 y 9 cm.

Se realizan de uno a tres pases máximo por paciente.

La técnica de punción aspiración la realizaron citopatólogos expertos.

Posibilidad de tinción in situ para evaluar la calidad del material.

Mínima utilización de técnicas de imagen en la PAAF de glándula salival. En los casos necesarios la técnica radiológica utilizada fue la tomografía axial computarizada o la ecografía.

Preparación de las muestras

Tras la obtención del material este se procesa extendiéndolo en dos frotis que se tiñen con técnicas convencionales. Parte del material se procesa con fijación en medio líquido.

TÉCNICAS CONVENCIONALES

Un frotis es teñido con técnica de Papanicolaou (Fig 30) y otro con Diff-Quik. Las principales ventajas de la tinción con Papanicolaou son la buena definición del detalle nuclear, la textura citoplasmática y la indicación de diferenciación de epitelio escamoso.

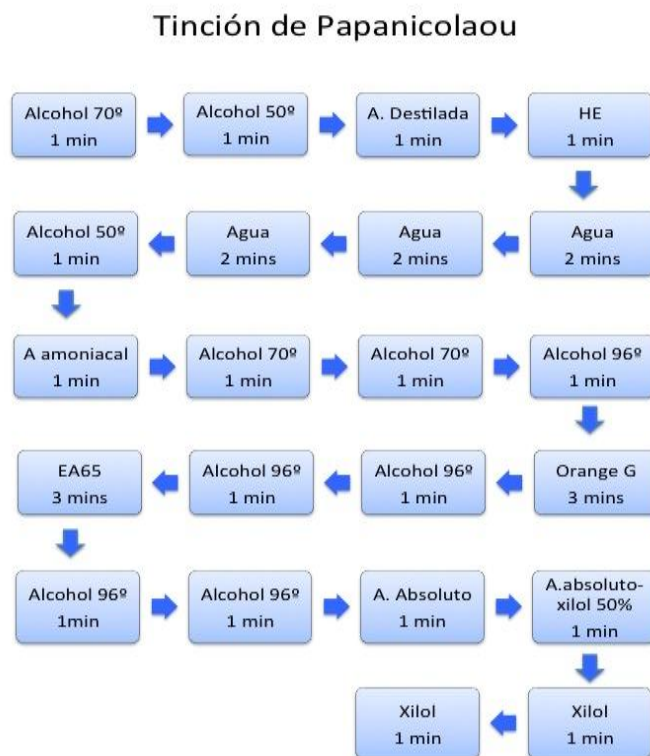


Figura 30. Tinción de Papanicolaou.

La tinción de Diff-Quik es una tinción modificada de Wright-Giemsa, utilizada sobre todo en hematología, aunque esta técnica muestra las características citoplasmáticas de las células y la matriz extracelular, no es una buena tinción para ver el detalle nuclear. Consta de un fijador y dos soluciones una eosinófila y otra basófila. La secuencia de tinción incluye entre 5 y 10 inmersiones de un segundo de duración, en el fijador, en el colorante rojo y en el colorante azul para finalizar con el lavado y posterior secado al aire de la preparación (Fig. 31).



Figura 31. Tinción de Diff-Quik.

FIJACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO Y TÉCNICAS DE INMUNOCITOQUÍMICA

Durante los últimos cuatro años hemos utilizado citología en base líquida Thin Prep. Se trata de incluir el material obtenido de una punción directamente en medio líquido (CytoLyt) y tras una fijación en este medio de aproximadamente 20', procesar este material mediante citocentrifugado, realizando un número variable de portas, según la cantidad de material obtenido en la punción (Fig. 32).



Figura 32. Citología en medio líquido.

Los viales tienen fecha de caducidad de tal manera que es posible que tras un periodo de tiempo variable no superior a los tres meses el material de la punción se encuentre degenerado y no sea posible su utilización para técnicas de inmunocitoquímica. De hecho, esto fue lo que sucedió con los primeros 9 casos de nuestra casuística. Hemos hecho una media de cuatro frotis por caso, sobre todo para la realización de técnicas de ICQ. También tuvimos dificultades con el anticuerpo PLAG1. En un principio elegimos el anticuerpo policlonal utilizado por Matsuyama A (1:500; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (85). Al ponernos en contacto con este autor nos respondieron que este anticuerpo había dejado de fabricarse. Con posterioridad utilizamos el anticuerpo policlonal de Biorbyt, comprobando en una serie de frotis su tinción citoplasmática y no nuclear. Por último identificamos en otros artículos, como en el de Rotellini M, el anticuerpo monoclonal PLAG1 (clone 3B7; Novus, Littleton, CO) (68) teniendo a su vez que hacer distintas pruebas y diluciones con la correspondiente pérdida de frotis de PAAF. Para efectuar estas técnicas los frotis teñidos con Papanicolaou se introducen en un buffer “epitope retrieval solution (containing detergent)” (10x): tampón citrato a 0,1mol/L con detergente (DAKO)

durante 20', para su recuperación antigénica. Una vez terminada la recuperación antigénica las muestras se colocaron en un equipo de inmunotinción automática en horizontal (Autostainer Link 48 DAKO). Se realizó la incubación con el anticuerpo primario (Tabla 6).

Marcador	Dilución	Clon	Casa comercial	Localización del marcaje
CK19	Prediluido	RCK 108	DAKO	Citoplasma
Calponina	1/100	CALP	DAKO	Citoplasma
p63	Prediluido	4 A 4	DAKO	Nuclear
PAGF	Prediluido	6F2	DAKO	Citoplasma
WT1	Prediluido	6F-H2	DAKO	Citoplasma
PLAG1	1/50	3B7	NOVUS	Nuclear

Tabla 6. Anticuerpos: dilución, clon, casa comercial y localización del marcaje.

Para la interpretación de los resultados de la ICQ se consideró la extensión de la tinción atendiendo a la siguiente escala:

- 0=ninguna célula teñida.
- 1= < del 10%.
- 2= 10-50%.
- 3=50-100%.

No se valoró el concepto de intensidad de inmunotinción. En este sentido los resultados se interpretaron como positivos o negativos.

Interpretación de los frotis

El citopatólogo que punciona el caso lo interpreta y lo diagnostica con consulta al resto del equipo formado por otros tres citopatólogos en los casos difíciles.

La información clínica es la obtenida de la hoja de petición del clínico que solicita la prueba, generalmente de la consulta de maxilofacial del hospital.

En los últimos años tenemos la posibilidad de visualización de pruebas radiológicas en la intranet del hospital.

Siguiendo la clasificación histológica de Foote FW y cols (56), hemos clasificado las PAAF del AP sometidas a técnicas de ICQ en: (1) predominio celular, (2) condromixoide y (3) mixtos. Si bien esta clasificación es histológica, si es tomada en cuenta en los diagnósticos diferenciales de la PAAF con otros tipos de tumores de la glándula salival, motivo por el cual hemos valorado su comportamiento con las técnicas de ICQ.

Como consecuencia del aprendizaje de nuestros errores diagnósticos en etapas anteriores hemos introducido, en los casos en donde no hay una absoluta certeza de que se trate de un AP, dos diagnósticos morfológicos abiertos a varias posibilidades diagnósticas. El primero es “tumor con patrón cilindromatoso”, comprendiendo el diagnóstico diferencial entre el AP y otros tumores con patrón cilindromatoso como el CAQ. El segundo término corresponde a “tumor benigno primario de glándula salival de la familia AP/mioepitelioma/adenoma de células basales”.

Correlación cito-histológica

La búsqueda de los casos se realizó revisando, en el sistema informático utilizado en el servicio de Anatomía Patológica para la emisión y registro de los pacientes (Pat-Win), los pacientes diagnosticados por PAAF de AP y comparando los resultados con la pieza quirúrgica. Así habrá casos diagnosticados por citología concordantes con la biopsia y casos erróneamente diagnosticados de AP, que consideramos como falsos positivos (FP). En lo que respecta a las biopsias hemos recogido además los casos diagnosticados de AP y que mostraron otro diagnóstico citológico, que consideramos como falsos negativos (FN).

Una buena prueba diagnóstica es la que ofrece resultados positivos en pacientes enfermos, en nuestro caso con AP, y negativos en sanos. Por lo tanto, las condiciones que deben ser exigidas a un test son:

Validez: es el grado en que un test mide lo que se supone que debe medir. ¿Con qué frecuencia el resultado del test es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos?. La sensibilidad y especificidad de un test son medidas de validez:

La sensibilidad (S) es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, en nuestro caso diagnosticarle un AP.

La fórmula es $VP / (VP + FN)$ (falsos negativos).

La especificidad (E) es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, en nuestro caso no diagnosticarle un AP.

La fórmula es $VN / (VN + FP)$ (falsos positivos).

Seguridad: La seguridad viene determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo. ¿Con que seguridad un test predecirá la presencia o ausencia de enfermedad?. Ante un resultado positivo de un test ¿qué probabilidad existe de que este resultado indique presencia de enfermedad?. Los valores predictivos positivos y negativos son medidas de la seguridad de una prueba diagnóstica:

El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test.

La fórmula del VPP es: $VP / (VP + FP)$.

El valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de que un paciente con un resultado negativo en el test esté realmente sano.

La fórmula de VPN es: $VN / (FN + VN)$.

Estudio histológico

Todas las biopsias estudiadas son de AP fijados en formol al 10% e incluidas en parafina. De los bloques de AP se realizaron cortes histológicos de 3 μ de espesor en un micrótomos de rotación (Microm HM 3505) que fueron rehidratados en alcoholes decrecientes, teñidos mediante hematoxilina de Harris y montados mediante Depex. En este trabajo se hizo el estudio histológico del caso y se seleccionó una preparación de cada uno de ellos. En ella se valoraron los diferentes tipos de células mioepiteliales:

1) Las zonas del “mioepitelio-like” o zonas parecidas a mioepitelio, que incluyen las células tubulares externas y las células fusiformes.

2) Las zonas del mioepitelio modificado que corresponde a las células estrelladas y poligonales de las regiones mixoides y condroides, así como a las células plasmocitoides o hialinas.

3) Las zonas del mioepitelio transformado que incluye las sábanas de células epitelioides, los nidos escamosos y las áreas cribiformes/basaloides.

La identificación de estas áreas se ha efectuado mediante el estudio de la morfología, con H/E, a excepción de las áreas basaloides en las que además de la morfología celular se ha evaluado la negatividad para CK19.

Técnica de inmunohistoquímica

En todos los casos se realizó el mismo procedimiento. Los cortes de los bloques se realizaron en cristales tratados para evitar el desprendimiento y se introdujeron durante 30' a 65° en estufa para desparafinarlos. La recuperación antigénica se realizó en el equipo PT Link DAKO, con un buffer Tris-EDTA pH=9 (DAKO) a 95° durante 20'. Una vez terminada la recuperación antigénica las muestras, tras pasar a un buffer 20x durante 10' para que se enfríen y desparafinen correctamente, se colocaron en un equipo de inmunotinción automática en horizontal (Autostainer Link 48 DAKO). Los anticuerpos utilizados están referidos en la Tabla 6. Los resultados de la inmunohistoquímica fueron valorados de la siguiente manera:

La extensión de la tinción se valoró atendiendo a la siguiente escala:

- 0= ninguna célula teñida.
- 1=<10%.
- 2=10-50%.
- 3=50-100%.

En cuanto a la intensidad de la tinción se consideraron tres niveles: ligera (+) moderada (++) e intensa (+++).

IV RESULTADOS

**APARTADO 1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PUNCIÓN
ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA DEL ADENOMA PLEOMÓRFICO
EN 212 PACIENTES DURANTE EL PRIMER PERIODO 1980-1994.
(GRUPO 1)**

Fine Needle Aspiration Cytology of Pleomorphic Adenoma. An Analysis of 212 cases.

Viguer JM, Vicandi B, Jimenez-Heffernan, JA, Lopez-Ferrer P, Limeres MA.

Acta Cytologica 1997;41:786-794.

Este trabajo corresponde a los objetivos 1 y 2

Punción aspiración con aguja fina del Adenoma Pleomórfico. Análisis de 212 casos

Objetivo: valorar la utilidad de la PAAF en el diagnóstico del AP y definir las variantes citológicas responsables de los errores diagnósticos.

Método: estudio retrospectivo de 212 casos citológicamente diagnosticados de AP. Se obtuvieron biopsias en 184 casos. También se revisaron 14 casos con diagnóstico histológico de AP y otro diagnóstico citológico. Este estudio está basado en casos con confirmación histológica.

Resultados: la sensibilidad y especificidad del diagnóstico citológico en nuestra serie fue de 92,6% y 98,4% respectivamente. En relación al diagnóstico de malignidad, la serie muestra 5 falsos diagnósticos negativos y 3 falsos diagnósticos positivos. Del total de casos correctamente diagnosticados por PAAF (175), 118 (67,4%) mostraron un patrón citológico clásico, sin problemas diagnósticos; el resto corresponden a variantes citológicas. La atipia celular (20,6%), la transformación quística (7%) y la presencia de un patrón cilindromatoso (5%), que recuerda al CAQ, fueron las variantes citológicas más frecuentes responsables de los errores diagnósticos.

Conclusión: las variantes citológicas del AP en PAAF deben de tenerse en cuenta para evitar errores en el manejo preoperatorio y quirúrgico de los pacientes con lesiones de glándula salival.

Fine Needle Aspiration Cytology of Pleomorphic Adenoma

An Analysis of 212 Cases

José M. Viguer, M.D., Blanca Vicandi, M.D., José A. Jiménez-Heffernan, M.D.,
Pilar López-Ferrer, M.D., and Miguel A. Limeres, M.D.

OBJECTIVE: To assess the value of fine needle aspiration cytology (FNAC) in the diagnosis of pleomorphic adenoma and to determine the cytologic variations responsible for diagnostic errors.

STUDY DESIGN: We retrospectively studied 212 cases cytologically diagnosed as pleomorphic adenoma. In 184 a histologic diagnosis was available. Fourteen cases of histologically proven pleomorphic adenomas with a previously erroneous cytologic diagnosis were also reviewed. This study was based on those cases with a histologic diagnosis.

RESULTS: The sensitivity and specificity of the cytologic diagnosis of pleomorphic adenoma in our series were 92.6% and 98.4%, respectively. In relation to malignancy, the series showed six false negative and three false positive diagnoses. In those cases correctly diagnosed on aspiration (175), a typical cytologic appearance, with no diagnostic difficulties, was observed in 118 cases (67.4%); the remainder showed cytologic variations. Cellular atypia (20.6%), cystic transformation (7%) and the presence of a cylindromatous pattern (5%) resembling

adenoid cystic carcinoma were the most common cytologic variations observed and responsible for the majority of the errors.

The use of FNAC in the diagnosis of salivary gland tumors, mainly PA, has high diagnostic accuracy with infrequent pitfalls.

CONCLUSION: The cytologic variations in FNAC of pleomorphic adenoma must be considered in order to avoid important errors in the preoperative management of and surgical approach to salivary gland lesions. (Acta Cytol 1997;41:786-794)

Keywords: adenoma, pleomorphic; salivary gland neoplasms; aspiration biopsy.

Fine needle aspiration cytology (FNAC) is an increasingly important diagnostic procedure used to evaluate salivary gland lesions and to assist in their preoperative management and overall therapy. It has proven to be a safe, cost-effective, rapid and accurate diagnostic method.^{5,8,12,29,33} Medical and surgical approaches to inflammatory lesions, benign neoplasms, and primary and metastatic malignancies differ considerably, so the preoperative di-

From the Department of Pathology, Hospital La Paz, Madrid, Spain.

Dr. Viguer is Chief, Cytology Section, and Associate Professor.

Drs. Vicandi, López-Ferrer and Limeres are Staff Cytopathologists.

Dr. Jiménez-Heffernan is Resident.

Address reprint requests to: José M. Viguer, M.D., Departamento de Anatomía Patológica, Hospital La Paz, Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid, Spain.

Presented in part at the XIIth International Congress of Cytology, Madrid, Spain, May 21-25, 1995.

agnosis is important when planning the nature and extent of treatment.^{3,13,17,21,25} At our institution, FNAC has been routinely used since 1980 in the initial evaluation and follow-up of salivary gland lesions.

Pleomorphic adenoma (PA), or mixed tumor, is the most common salivary gland neoplasm, accounting for about 65% of salivary gland tumors. Although it has a great histologic diversity, the cytologic diagnosis of PA in most cases is easy due to its typical cytologic image. The combination of bland epithelial cells and fragments of chondromyxoid stroma with spindle cells is very characteristic of this tumor. However, in some cases major variations from this common cytologic pattern exist, resulting in an erroneous cytologic diagnosis in many of them and subsequently in a different treatment of or surgical approach to the tumor. We reviewed our experience with the cytologic diagnosis of PA during a 14-year period. The present study compared the cytology results with those of histopathology; attention was focused on those cytologic variations of PA that could result in misdiagnosis and different clinical management of the tumor.

Materials and Methods

Fine needle aspiration was performed on 739 cases of primary salivary gland lesions between 1980 and 1994. We reviewed all the cases cytologically diagnosed as PA and compared our results to those of histopathology. We also examined 14 cases of PA with a previously erroneous cytologic diagnosis. Our study was based on those cases with a histologic diagnosis. A total of 212 specimens from 210 patients, 83 males and 127 females, with a mean of age of 46.4 years (range, 15-89), were examined. In 184 of them a histologic report was available. The FNAC procedure was performed by experienced cytopathologists using 23-25-gauge needles. Two to three separate aspirates were obtained from different tumor sites. The air-dried smears were routinely stained with Diff-Quik. In most cases, alcohol-fixed smears were obtained and stained by a modified Papanicolaou method. Surgical biopsy specimens were processed routinely and stained with hematoxylin and eosin. When necessary, special histologic stains were performed.

Results

In 184 of the 212 cases, a histologic diagnosis was available. Cytohistologic agreement was present in 175 cases. Lack of correlation was observed in nine

Table I Cases Erroneously Diagnosed on Cytology as PA

Cytologic diagnosis	Histologic diagnosis	No. of cases
PA	Malignant mixed tumor	3
PA	Adenoid cystic carcinoma	1
PA	Metastatic basal cell carcinoma	1
PA	Monomorphic adenoma	2
PA	Myoepithelioma	2

cases (Table I). In five of these cases malignant tumors were misdiagnosed on cytology as PA. The remaining four corresponded to other benign tumors. The specificity of the cytologic diagnosis of PA was 98.4%, with a false positive rate of 1.6%. In 14 cases a histologic diagnosis of PA was given after a previously erroneous cytologic diagnosis and surgical excision of the tumor (Table II). The sensitivity of the cytologic diagnosis of PA reached 92.6%, with a false negative rate of 7.1%. In relation to malignancy, our series showed six false negative and three false positive diagnoses. Three malignant mixed tumors were misdiagnosed as PA on aspiration. In two of these cases a rich cellular smear with epithelial atypia was observed but not in such a grade as to make us suspect malignancy. The third case showed no atypia, but after histologic examination, malignant mixed tumor was diagnosed. One case diagnosed as PA on FNAC proved to be an adenoid cystic carcinoma histologically. The typical metachromatic globules were absent, and a prominent myxoid stroma erroneously suggested the diagnosis. Finally, one case with a histologic diagnosis of metastatic basal cell carcinoma was reported on cytology as PA. The previous history of nasal basal cell carcinoma was unavailable at the time of FNAC. Smears from the tumor showed moderate cellularity with small cells with scanty cytoplasm and round to oval nuclei. Amorphous, myxoid ma-

Table II Cases of PA with a Previous Erroneous Cytologic Diagnosis

Cytologic diagnosis	Histologic diagnosis	No. of cases
Nonneoplastic cystic lesion	PA	7
Nonrepresentative	PA	2
Chronic sialoadenitis	PA	1
Adenoid cystic carcinoma	PA	1
Low grade mucoepidermoid carcinoma	PA	1
Malignant mixed tumor	PA	1
Neurinoma	PA	1

terial was seen in the background. No papillary groups, palisading or atypia was seen. Two cases of

Variations in the cytologic image of PA are relatively common and can result in diagnostic errors.

monomorphic adenoma were misdiagnosed cytologically as PA. Both showed epithelial cell predominance and, as in the two cases of myoepithelioma, were indistinguishable cytologically from epithelium-rich variant of PA.

In 14 cases with a histologic diagnosis of PA after surgical removal of the tumor, the previous cytologic report was erroneous (Table II). In seven of them a cytologic diagnosis of benign nonneoplastic cystic lesion was given instead of PA. Different amounts of fluid were aspirated in these cases. Examination of the smears showed an amorphous mucoid background with macrophages and occasional isolated epithelial cells. Histologic examination of the tumors showed PA with cysts of different sizes surrounded by neoplastic cells. In two cases either insufficient or absent neoplastic cells in the smears were responsible for the negative diagnosis. The presence of metachromatic globules with a cylindromatous pattern in one case led us erroneously to favor the diagnosis of adenoid cystic carcinoma. In another case prominent epithelial atypia with irregular nuclear shapes and hyperchromasia was observed, and a cytologic diagnosis of malignant mixed tumor was given. Parotidectomy was performed, and after histologic examination only small foci of atypical epithelial cells were found, and no histologic criteria of malignancy were present.

One PA was misdiagnosed as low grade mucoepidermoid carcinoma on aspiration. The presence, in this case, of a cystic aspirate with a dirty background and metaplastic squamous atypical cells made us favor this diagnosis instead of PA. Absence of stromal elements and predominance of spindle cells led us to erroneously diagnose a PA as a benign spindle cell tumor (neurinoma).

Review of those tumors correctly diagnosed on aspiration as PA (175) showed cellular atypia in 36 cases (20.6%). Twelve tumors (7%) consisted of cystic lesions that microscopically were identified as PA due to recognition, on the smears, of character-

istic epithelial and stromal elements. In nine cases (5%), PA disclosed a cylindromatous pattern with the presence of metachromatic globules. Intranuclear cytoplasmic inclusions were observed frequently. No crystalline deposits were present in our smears.

None of the patients included in this study had evidence of tumor implantation at the site of the needle track. No complications other than occasional hematoma formation were observed in relation to FNAC. Histopathologic changes related to previous aspiration of the tumor, such as necrosis or infarction, were not present in our tumor samples.

Discussion

Due to the obvious advantages of a preoperative diagnosis, many medical centers use FNAC in the initial evaluation of salivary gland lesions.^{3,26,28,30,31} The accuracy of the diagnosis of salivary tumors by this method has been well established.^{8,16,19,24,27} However, there are still discrepancies in the clinical utility and benefits from its use.¹ In PA of the salivary gland a specific diagnosis can be rendered by FNAC since in most cases the cytology of aspirates from these tumors shows characteristic features. The reliability of FNAC in diagnosing PA has been reported as 89.5–96.2%. Nevertheless, the diagnostic problems may be considerable, and there are cases in which a specific diagnosis cannot be provided. Layfield et al showed that in salivary gland aspirates most diagnostic problems arise not only with well-known diagnostic challenges, such as mucoepidermoid carcinoma, chronic sialadenitis and lymphoma, but also with PA.¹⁸ In order to facilitate the distinction from other salivary gland neoplasms, the immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein has been introduced as a specific marker of PA.⁶ Minor variations of the cytologic image of PA are occasionally seen and consist of duct cell metaplasia (mucinous, squamous, oxyphilic and sebaceous), variable stromal cellularity, crystal deposition (tyrosine) and intranuclear cytoplasmic inclusions.^{2,4,22} These changes occur usually on a smear that shows an otherwise typical PA. In most of these cases no important diagnostic considerations arise, and the cytologic diagnosis of PA remains unchanged. However, in other cases major variations from the common cytologic pattern are present, resulting in a difficult differential diagnosis. In our series we especially studied those cases of PA with uncommon cytologic presentations and a difficult

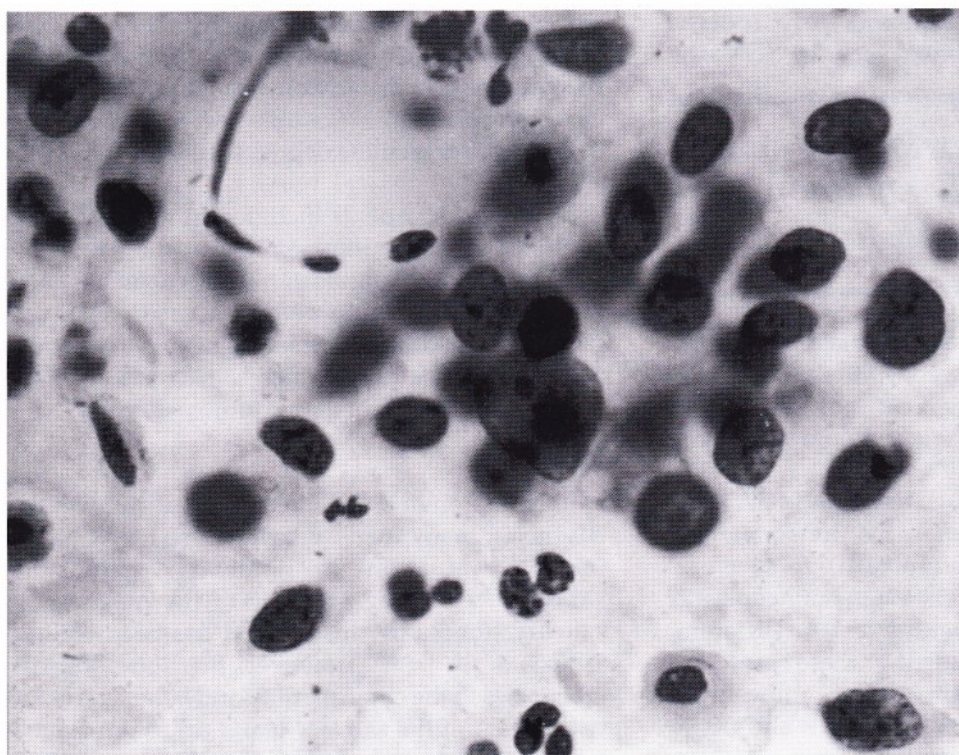


Figure 1 Smears of pleomorphic adenoma with focal areas of naked nuclei showing pleomorphism, hyperchromasia and irregular contours. In this case an erroneous diagnosis of carcinoma expleomorphic adenoma was given (Papanicolaou stain, $\times 700$).

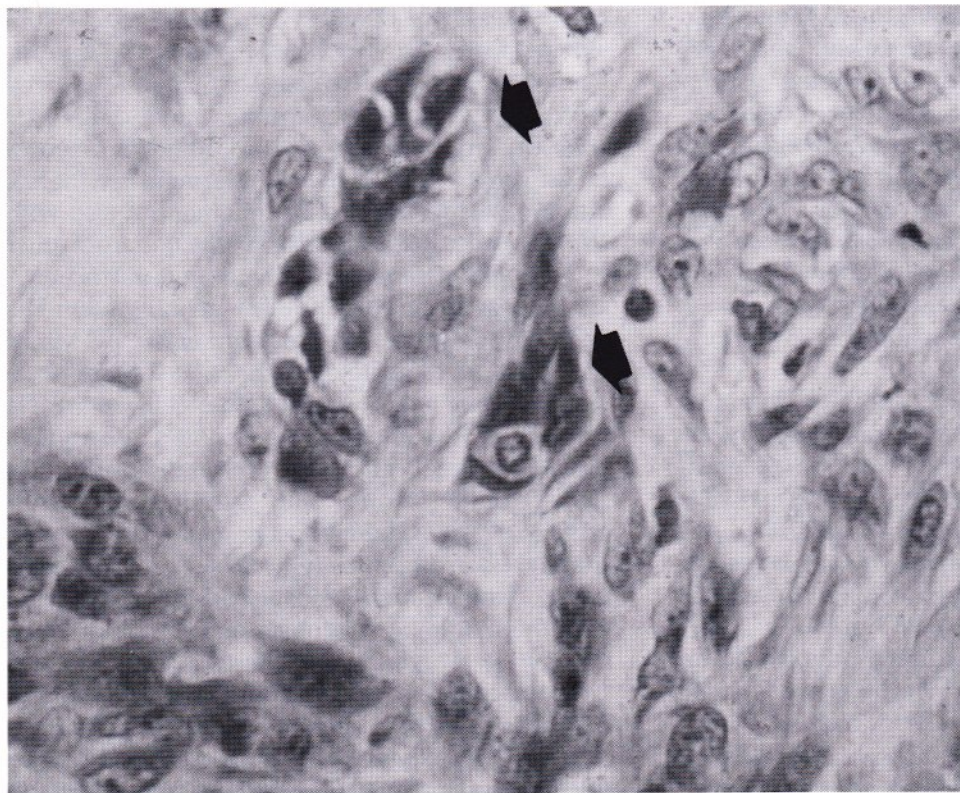


Figure 2 Histologically pleomorphic adenoma from Figure 1 showing occasional foci of atypical epithelial cells (arrows). No malignancy was observed (hematoxylin and eosin, $\times 450$).

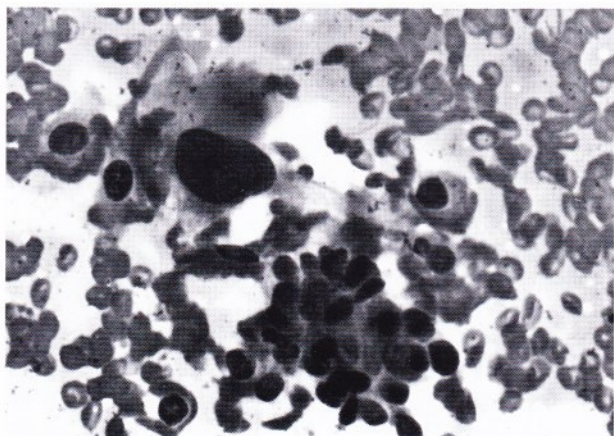


Figure 3 Pleomorphic adenoma with cellular atypia. Nuclear pleomorphism is easily recognizable. Note the uniform distribution pattern of the chromatin (Diff-Quik, $\times 400$).

or erroneous cytologic diagnosis that could result in different treatment of the tumor. After analyzing our diagnostic errors and those cases with a difficult diagnosis, we divided the cytologic presentation of PA into four groups: (1) PA with a typical cytologic pattern and no diagnostic problems (118 cases, 67.4%), (2) PA with cellular atypia (36 cases, 20.6%), (3) cystic PA (12 cases, 7%), and (4) cylindromatous PA (9 cases, 5%).

In our tumor samples atypia was a relatively common finding. Usually nuclear pleomorphism was easily recognized and not as prominent as to make us suspect malignancy. Eneroth and Zajizeck, in their study of 316 PAs, found 17 cases with cytologic features of malignancy that proved to be benign on histology.⁷ More recently Chan et al³ showed atypical nuclei in 15 of 31 PAs. Caution is advised whenever slight to moderate atypia is seen alone in a smear of PA. In one of our cases we erroneously reported malignant mixed tumor, and after histologic examination no malignancy was present. This case showed a highly cellular aspirate with prominent nuclear pleomorphism and hyperchromasia (Figure 1). Histologic review of the tumor showed small foci of pleomorphic, atypical epithelial cells within an otherwise normal PA, with no invasion (Figure 2).

In three cases a final histologic diagnosis of malignant mixed tumor was present in cases preoperatively diagnosed on FNAC as PA. After reviewing these false negative diagnoses, no cytologic criteria

of malignancy were present in one of them, and the remaining two showed areas of moderate epithelial atypia. Similar errors have been described in different FNAC studies of the salivary glands.^{5,15} Sampling errors can occur when the malignant component is small, resulting in false negative diagnoses and as suggested by Ehya,¹¹ we believe that some of these errors can be resolved with a wider sampling of the tumor, in order to obtain smears from the areas with malignant transformation. Usually we aspirate two different sites of the same lesion, but in cases in which malignancy is suspected clinically and aspiration is well tolerated by the patient more samples are obtained for examination. Thirty-six of our samples showed easily recognizable atypia (Figure 3). This is a relatively common finding in PA, and, in our experience, if it is seen alone in the absence of other cytologic signs of malignancy, it



Figure 4 Low-power photomicrograph of pleomorphic adenoma showing multiple cystic spaces of variable size (hematoxylin and eosin, $\times 25$).

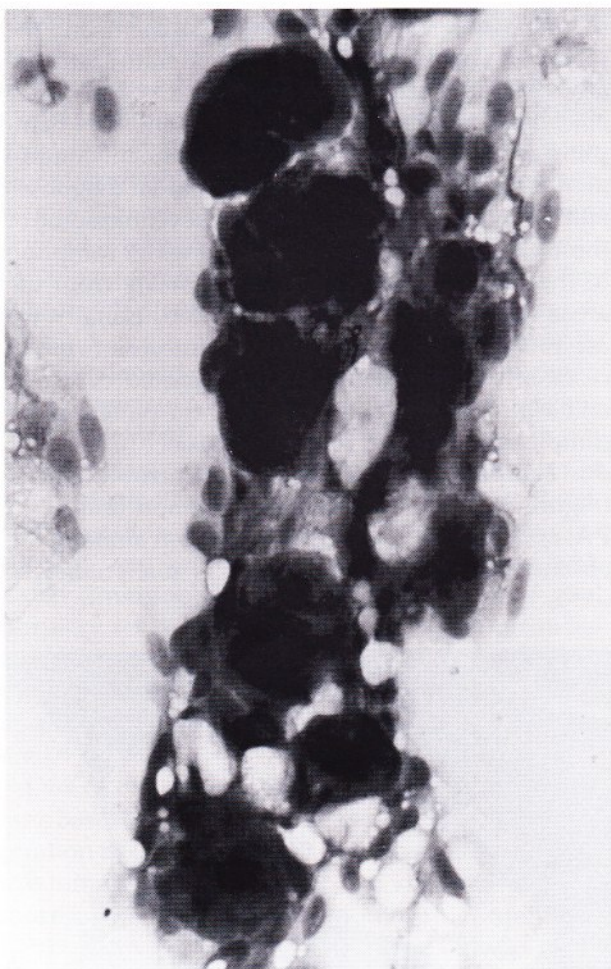


Figure 5 Smear of pleomorphic adenoma with a cylindromatous pattern. Spherical balls of stroma are surrounded by epithelial cells. Note the presence of cytoplasm and bland nuclei of epithelial cells (Diff-Quik, $\times 400$).

should not be considered enough criteria for malignancy.

Although we avoid using descriptive diagnoses, there are some cases in which marked epithelial atypia is present without any other cytologic criteria of malignancy. In these cases we favor the diagnosis of PA with epithelial atypia and defer the final diagnosis to histology.

Another important diagnostic problem is related to cystic lesions. There are an extensive number of cystic lesions of the salivary glands, including non-neoplastic lesions and benign and malignant neoplasms (primary or metastatic). Our series showed seven cases that were diagnosed on cytology as benign nonneoplastic cystic lesions, and final histo-

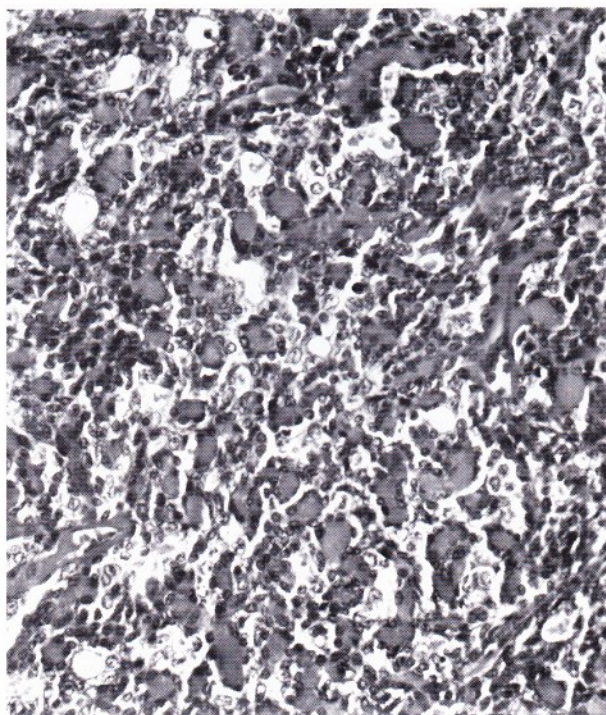


Figure 6 Histologically, pleomorphic adenoma from Figure 4, showing multiple ball-like structures of stroma lined with epithelial cells. These structures are responsible for the cylindromatous pattern seen on smears (hematoxylin and eosin, $\times 150$).

logic examination disclosed PA. These cases showed cystic changes of variable size within the tumor and neoplastic cells lining some of the cystic spaces (Figure 4). Cystic change, cystic degenera-



Figure 7 Smear of metastatic basal cell carcinoma. Fibrillary myxoid stroma and an epithelial group of cells erroneously suggesting pleomorphic adenoma (Papanicolaou stain, $\times 200$).

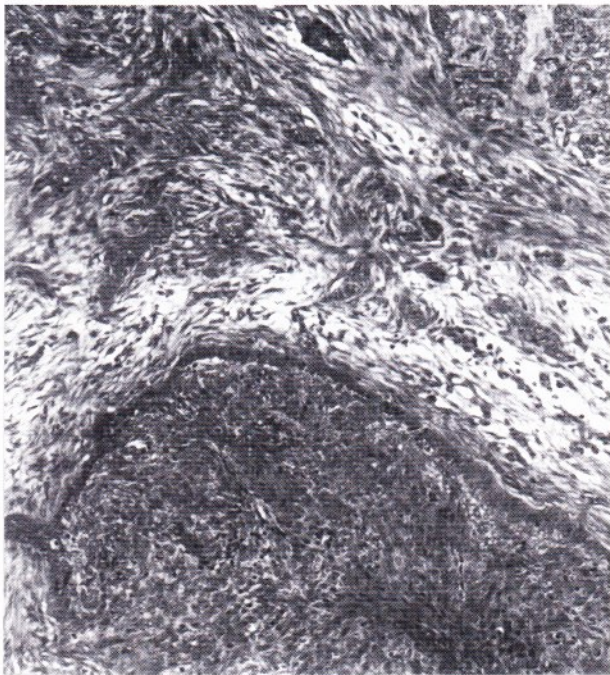


Figure 8 Histologic image of basal cell carcinoma metastatic to the parotid gland. Desmoplastic stroma can be confused cytologically with chondromyxoid stroma of pleomorphic adenoma, especially in Papanicolaou-stained smears (hematoxylin and eosin, $\times 100$).

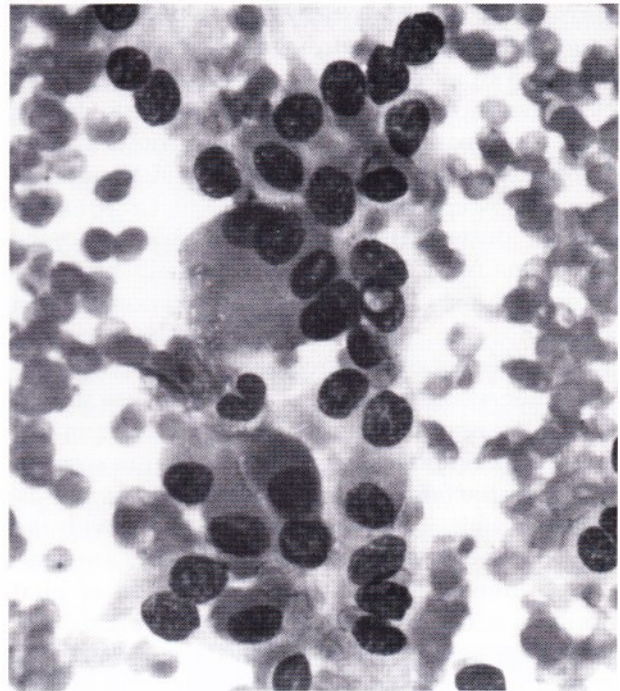


Figure 9 Group of epithelial cells with intranuclear inclusion in one of them (Diff-Quik, $\times 700$).

tion and mucin production have been described as occurring in PA and leading to difficult histologic and cytologic diagnoses.^{23,32} After reviewing our smears, no epithelial cells or stromal elements that could suggest the correct diagnosis were present.

In our series, cystic changes of PA accounted for the major number of misdiagnoses, which were made during our first years of practice with salivary gland aspiration cytology. We now completely aspirate all cystic lesions and reaspirate even if minor, residual swelling is present. All the material obtained is submitted for detailed cytologic examination. This practice has considerably diminished the number of false negative diagnoses in the last years.

Low grade mucoepidermoid carcinoma, Warthin's tumor, acinic cell carcinoma, metastatic squamous cell carcinoma, benign nonneoplastic lesions and PA can show cystic changes with aspirates dominated by abundant mucinous material and scant cellularity. PA should be suspected when epithelial and stromal elements are identified within the mucinous material. If no stromal elements are present and only epithelial cells are recognized, we

think that the diagnosis of salivary gland neoplasm not otherwise specified is justified. This diagnosis would mandate surgical exploration of the lesion. In one case we erroneously diagnosed low grade mucoepidermoid carcinoma, and the final histologic examination disclosed PA with occasional cystic areas.

Mucoepidermoid carcinoma is said to be the most difficult salivary gland tumor to diagnose on FNAC.¹⁷ To avoid this problem, the presence of squamous, intermediate and vacuolated cells is necessary for the diagnosis of mucoepidermoid carcinoma. Cases are described of low grade mucoepidermoid carcinoma arising in PA, and although infrequent, this possibility should also be considered.¹⁴

In two cases cytohistologic discrepancies arose with the diagnosis of adenoid cystic carcinoma and PA. One case was erroneously reported on FNAC as PA, and histology showed adenoid cystic carcinoma. The second case was diagnosed cytologically as adenoid cystic carcinoma, and the final diagnosis was PA. Both cases showed cylindromatous structures consisting of metachromatic globules

surrounded by neoplastic cells. In nine cases in our series PA with a cylindromatous pattern was present, and in all of them the possibility of adenoid cystic carcinoma was considered (Figure 5). Histologic examination of these tumors showed occasional spherical structures of stromal tissue surrounded by epithelial cells (Figure 6). On cytology it is not always easy to differentiate adenoid cystic carcinoma from PA. The neoplastic cells have less cytoplasm, smaller and hyperchromatic nuclei in adenoid cystic carcinoma. Stromal tissue can be seen in adenoid cystic carcinoma, but it is, in general, homogeneous as opposed to the fibrillary stroma of PA. We apply these morphologic criteria in differential diagnosis; nevertheless, there are cases in which distinction between these tumors is not always possible. These cases are discussed with the surgeon, and both diagnostic possibilities are evaluated. Immunohistochemical expression of glial fibrillary acid protein can be used to distinguish between the two tumors. The possibility of adenoid cystic carcinoma arising in PA has been described and, although infrequent, should also be considered.⁹

One of our diagnostic errors concerned a metastatic basal cell carcinoma that we interpreted on aspiration as a PA (Figure 7). It is possible to confuse this tumor with an epithelial-rich variant of PA and, more commonly, with monomorphic adenoma. Retrospectively, smears of this case showed small cells with scanty cytoplasm and a basaloid appearance. Amorphous myxoid material was seen instead of the typical chondromyxoid stroma of PA, but neither palisading nor nuclear atypia was observed. It has been noted that the desmoplastic stroma of basal cell carcinoma can mimic the chondromyxoid matrix of PA (Figure 8).³¹

Benign primary neoplasms of the salivary gland, such as monomorphic adenoma and myoepithelioma, can be easily mistaken for PA on cytology. A highly cellular smear with scanty stromal elements can correspond to one of these tumors and nevertheless be diagnosed as PA. From a practical perspective this confusion is of minor importance since the surgical treatment is similar in both cases.

The similarities between PA and neurinoma on cytology have been described previously.²⁰ In one of our cases a predominantly fusocellular tumor with an unclear relation to a salivary gland made us erroneously interpret a PA as a neurinoma. This potential pitfall should be considered in order to achieve a correct diagnosis.

The presence of intranuclear cytoplasmic inclusions in a PA that was misdiagnosed as papillary thyroid carcinoma have been described. Intranuclear inclusions were frequently seen in our cases (Figure 9). We conclude that they are a relatively common finding in smears from PA and their presence should not rule out this diagnosis.

Histologic diagnostic problems in tissues, including the salivary gland, previously sampled by aspiration have been described.¹ They vary from minor histopathologic changes to complete infarction and necrosis of the tumor, making a histologic diagnosis impossible. Two cases of necrosis of a parotid PA following FNAC have been reported.¹⁰ In our series to significant histologic changes were observed after FNAC, and necrosis of the tumor was never seen. We have seen a case of Warthin's tumor with complete tumor necrosis after FNAC. We think that these complications, although possible, are infrequent.

In summary, our study showed that the use of FNAC in the diagnosis of salivary gland tumors, mainly PA, has high diagnostic accuracy with infrequent pitfalls. Variations in the cytologic image of PA are relatively common and can result in diagnostic errors. The aspiration of a cystic lesion and the presence in the smear of cellular atypia or metachromatic globules similar to those of adenoid cystic carcinoma accounted for most of our errors and should be cautiously evaluated. Reaspiration and thorough examination of the smears in the first cases, aspiration from different tumor sites if malignant mixed tumor is suspected and detailed examination of the epithelial cells if the differential diagnosis with adenoid cystic carcinoma arises are important measures in order to avoid these diagnostic errors.

Acknowledgments

We wish to thank Angel Alvaro for bibliographic assistance.

References

1. Batsakis JG, Sneige N, El-Naggar AK: Fine-needle aspiration of salivary glands: Its utility and tissue effects. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1992;101:185-188
2. Bottles K, Ferrel LD, Miller TR: Tyrosine crystals in fine needle aspirates of a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Acta Cytol* 1984;28:490-492
3. Chan MKM, McGuire LJ, King W, Li AKC, Lee JCK: Cytodiagnosis of 112 salivary gland lesions: Correlation with histologic and frozen section diagnosis. *Acta Cytol* 1992;36:353-363

4. Cohen MB, Ljung BME, Boles R: Salivary gland tumors: Fine-needle aspiration vs frozen-section diagnosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112:867-869
5. Cramer H, Layfield L, Lampe H: Fine needle aspiration of salivary gland lesions. *Cytopathol Annu* 1993;8:181-206
6. Domagala W, Halcy-Kowalik L, Weber K, Osborn M: Coexpression of glial fibrillary acid protein, keratin and vimentin: A unique feature useful in the diagnosis of pleomorphic adenoma of the salivary gland in fine needle aspiration biopsy smears. *Acta Cytol* 1988;32:403-408
7. Eneroth CM, Zajizek J: Aspiration biopsy of salivary gland tumors: III. Morphologic studies on smears and histologic sections from 386 mixed tumors. *Acta Cytol* 1966;10:440-454
8. Frable MA, Frable WJ: Fine-needle aspiration biopsy of salivary glands. *Laryngoscope* 1991;101:245-249
9. Geisinger KR, Reynolds GD, Vance RP, McGuirt WF: Adenoid cystic carcinoma arising in a pleomorphic adenoma of the parotid gland: An aspiration cytology and ultrastructural study. *Acta Cytol* 1985;29:522-526
10. Gottschalk-Sabag S, Glick T: Necrosis of parotid pleomorphic adenoma following fine needle aspiration: A case report. *Acta Cytol* 1995;39:252-254
11. Hadju SI, Ehya H, Frable WJ, Geisinger KR, Gompel CM, Kern WH, Löwhagen T, Oertel YC, Ramzy I, Rilke FO, Saigo PE, Suprun HZ, Yazdi HM: The value and limitations of aspiration cytology in the diagnosis of primary tumors: A symposium. *Acta Cytol* 1989;33:741-790
12. Heller KS, Attie JN, Dubner S: Accuracy of frozen section in the diagnosis of salivary tumors. *Am J Surg* 1993;166:424-427
13. Heller KS, Dubner S, Chess Q, Attie JN: Value of fine needle aspiration biopsy of salivary gland masses in clinical decision-making. *Am J Surg* 1992;164:667-670
14. Jacobs JC: Low grade mucoepidermoid carcinoma ex pleomorphic adenoma: A diagnostic problem in fine needle aspiration biopsy. *Acta Cytol* 1994;38:93-97
15. Jayaram N, Ashim D, Rajwanshi A, Radhika S, Banerjee CK: The value of fine-needle aspiration biopsy in the cytodiagnosis of salivary gland lesions. *Diagn Cytopathol* 1989;5:349-354
16. Kline TS, Merriam JM, Shapshay SM: Aspiration biopsy cytology of the salivary gland. *Am J Clin Pathol* 1981;76:263-269
17. Layfield LJ, Glasgow BJ: Diagnosis of salivary gland tumors by fine-needle aspiration cytology: A review of clinical utility and pitfalls. *Diagn Cytopathol* 1991;7:267-272
18. Layfield LJ, Tan P, Glasgow BJ: Fine-needle aspiration of salivary gland lesions: Comparison with frozen sections and histologic findings. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:346-353
19. MacLeod CB, Frable WJ: Fine-needle aspiration biopsy of the salivary gland: Problem cases. *Diagn Cytopathol* 1993;9:216-225
20. Mair S, Leiman G: Benign neurilemmoma (Schwannoma) masquerading as a pleomorphic adenoma of the submandibular salivary gland. *Acta Cytol* 1989;33:907-910
21. Mehle ME, Kraus DH, Wood BG, Benninger MS, Eliachar I, Levine HL, Tucker HM, Lavertu P: Facial nerve morbidity following parotid surgery for benign disease: The Cleveland Clinic Foundation experience. *Laryngoscope* 1993;103:386-388
22. Murty DA, Sodhani P: Intranuclear inclusions in pleomorphic adenoma of salivary gland: A case report. *Diagn Cytopathol* 1993;9:194-196
23. Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E: Pleomorphic adenoma of parotid gland with cystic degeneration. *J Laryngol Otol* 1994;108:446-448
24. O'Dwyer P, Farrar WB, James AG, Finkelmeier W, McCabe DP: Needle aspiration biopsy of major salivary gland tumors: Its value. *Cancer* 1986;57:554-557
25. Owen ERTC, Banerjee AK, Prichard AJN, Hudson EA, Kark AE: Role of fine needle aspiration cytology and computed tomography in the diagnosis and parotid swellings. *Br J Surg* 1989;76:1273-1274
26. Pitts DB, Hilsinger RL, Karandy E, Ross JC, Caro JE: Fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of salivary gland disorders in the community hospital setting. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;118:479-482
27. Quizilbash AH, Sianos J, Young JEM, Archibald SD: Fine needle aspiration cytology of major salivary glands. *Acta Cytol* 1985;29:503-512
28. Rodriguez HP, Siver CE, Moisa II, Chacho MS: Fine needle aspiration of parotid tumors. *Am J Surg* 1989;158:342-344
29. Roland NJ, Caslin AW, Smith PA, Turnbull LS, Panarese A, Jones AS: Fine needle aspiration cytology of salivary gland lesions reported immediately in a head and neck clinic. *J Laryngol Otol* 1993;107:1025-1028
30. Shasha AR, Webber C, DiMaio T, Jaffe BM: Needle aspiration biopsy in salivary gland lesions. *Am J Surg* 1990;160:373-376
31. Stanley MW, Horwitz CA, Bardeles RH, Stern SJ: Basal cell carcinoma metastatic to the salivary glands: Differential diagnosis in fine needle aspiration (FNA) cytology. *Acta Cytol* 1995;39:1031
32. Stanley MW, Löwhagen T: Mucin production by pleomorphic adenomas of the parotid gland: A cytologic spectrum. *Diagn Cytopathol* 1990;6:49-52
33. Yousem DM: Dashed hopes for MR imaging of the head and neck: The power of the needle. *Radiology* 1992;184:25-26

APARTADO 2. RESULTADOS DEL ESTUDIO COMPARATIVO EN EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DEL ADENOMA PLEOMÓRFICO DURANTE DOS PERIODOS DE TIEMPO (1980-1994 Y 1995-2003). (GRUPO 2)

Cytologic Diagnostic Accuracy in Pleomorphic Adenoma of the Salivary Glands During 2 Periods. A Comparative Analysis

Viguer JM, Jimenez-Heffernan JA, Vicandi B, Lopez-Ferrer P, Navarro M.

Acta Cytologica 2007;51:16-20.

Este trabajo corresponde al objetivo 3.

Precisión del diagnóstico citológico por PAAF del AP de glándula salival durante dos periodos. Análisis comparativo.

Objetivo: determinar si la experiencia, en el reconocimiento de las distintas formas citológicas de presentación del AP, puede reducir el número de errores diagnósticos.

Método: estudio comparativo de la precisión diagnóstica en el AP durante dos periodos de tiempo (1980-1994 y 1995-2003). El primer periodo incluye 198 tumores y el segundo 230. Se dividieron los errores en mayores y menores, dependiendo de la relevancia en el manejo de los pacientes. Fueron considerados errores mayores aquellos que pudieron producir tratamientos quirúrgicos inadecuados o demoras en el tratamiento.

Resultados: los resultados concordantes aumentaron del 88,4% al 92,2% entre el primero y segundo periodo. La sensibilidad aumento del 92,6% al 95,5%. Los falsos negativos disminuyeron del 7,1% al 4,5%. En lo que respecta a malignidad, los falsos negativos disminuyeron de 5 a 3. En el segundo periodo no se realizaron falsos diagnósticos positivos de malignidad, mientras que en el primero fueron 3. Del total de 42 errores diagnósticos, 6 fueron no representativos. Trece de los 36 restantes (36,1%) se consideraron errores mayores mientras que 23 (63,9%) se clasificaron como menores. Los errores mayores disminuyeron de 8 a 5. La reducción más significativa en el número de errores se dio en los casos con transformación quística.

Conclusión: La precisión en el diagnóstico citológico del AP es alta y puede haber una disminución de los errores mayores si se presta especial atención a algunos problemas. La limitación del muestreo de la PAAF y las dificultades en la interpretación pueden impedir en ocasiones la diferenciación entre un AP y un carcinoma ex-AP y un CAQ. Algunos errores diagnósticos son difíciles de evitar. Las biopsias pequeñas no resuelven el problema.

Cytologic Diagnostic Accuracy in Pleomorphic Adenoma of the Salivary Glands During 2 Periods

A Comparative Analysis

José M. Viguer, M.D., José A. Jiménez-Heffernan, M.D., M.R.C.Path., Blanca Vicandi, M.D., Pilar López-Ferrer, M.D., Ph.D., and Marta Navarro, M.D.

Objective

To determine if previous experience with the cytologic presentation of pleomorphic adenoma (PA) results in a lower number of diagnostic errors.

Study Design

Comparative analysis of the diagnostic accuracy of PA during 2 periods (1980–1994 and 1995–2003). The first period included 198 tumors and the second, 230. Diagnostic errors were divided into major or minor according to the consequences for patient management. Major errors were considered those that could result in an erroneous surgical approach or treatment delay.

Results

Concordant results increased from 88.4% to 91.2%. Sensitivity rose from 92.6% to 95.5%. The false negative rate diminished from 7.1% to 4.5%. Regarding malignancy, false negative diagnoses diminished from 5 to 3. The second period included no false positive diagnoses of malignancy, while the first had 3. A total of 42 errors were present, 6 of

them were nonrepresentative cases. Thirteen of the remaining 36 (36.1%) were considered major errors, while 23 (63.9%) were classified as minor errors. Major errors diminished from 8 to 5. The most significant reduction in errors occurred in the category of PA showing cystic transformation.

The accuracy of the cytologic diagnosis of PA is high....

Conclusion

Cytologic diagnostic accuracy of PA is high, and major errors may diminish if special attention is paid to some pitfalls. Sampling limitations

and interpretive difficulties may prevent differentiation from a few cases of carcinoma ex-PA and adenoid cystic carcinoma (ACC). A few diagnostic errors are difficult to avoid. Small tissue biopsies will not resolve these problems. (Acta Cytol 2007;51:16–20)

Keywords: adenoma, pleomorphic; salivary gland neoplasms; aspiration biopsy, fine-needle.

In 1997 we reported our experience with the diagnosis of pleomorphic adenoma (PA) of the salivary

From the Departments of Pathology, University Hospital la Paz; Autonomous University; and Alcalá de Henares University, Madrid, Spain.

Dr. Viguer is Head, Cytopathology Section, Department of Pathology, University Hospital La Paz.

Dr. Jiménez-Heffernan is Pathologist, Department of Pathology, University Hospital Guadalajara.

Drs. Vicandi and López-Ferrer are Cytopathologists, Department of Pathology, University Hospital La Paz.

Dr. Navarro is Pathology Resident, Department of Pathology, University Hospital La Paz.

Presented in part at the 31st European Congress of Cytology, Paris, October 2–5, 2005.

Address correspondence to: José A. Jiménez-Heffernan, M.D., M.R.C.Path., Departamento de Anatomía Patológica, University Hospital Guadalajara, Donantes de sangre s/n, 19002-Guadalajara, Spain (jjheffernan@yahoo.com).

Financial Disclosure: The authors have no connection to any companies or products mentioned in this article.

Received for publication September 29, 2005.

Accepted for publication October 20, 2005.

glands during a 14-year period (1980–1994).¹ That report described a cytohistologic correlation analysis of 198 histologic cases (189 PA and 9 other tumors). Special emphasis was given to the potential diagnostic pitfalls of this neoplasm. The sensitivity of that series reached 92.6%. Regarding malignancy, 5 false nega-

The number of major errors may diminish if special attention is paid to some pitfalls.

tive and 3 false positive diagnoses occurred. The high accuracy of the cytologic diagnosis is well reflected in other series.^{2–5}

During recent years we have become interested in determining if our previous experience with and knowledge of the cytologic presentation of PA would result in a lower number of diagnostic errors, or at least in errors without a negative impact on patient management. Therefore, we reviewed the cytohistologic correlation in a similar number of cases studied for the period from 1995–2003. A total of 221 histologically proven PA and 9 other tumors with previous fine needle aspiration (FNA) study were reviewed.

Material and Methods

Diagnostic parameters and errors from the 2 study periods were compared. Data from the first period were obtained from the previously reported study.¹ Using a similar method, diagnostic parameters from the second period were recorded. Cytologic and histologic cases diagnosed during a 9-year period were included in the study. All the cytologic diagnoses of PA were reviewed and compared to those of histopathology. We also examined 10 cases of PA with a previous nonrepresentative or erroneous cytologic diagnosis. The study was based exclusively on cases with a histologic diagnosis.

A total of 221 histologically proven PA and 9 other tumors, each of them with an FNA study, were reviewed. From a practical perspective, errors were divided into major or minor according to the consequences for patient management. Major errors were defined as those that could result in an erroneous surgical approach or treatment delay. The present series included the following major errors: malignant PA, adenoid cystic carcinoma (ACC), mucoepidermoid carcinoma and sialoadenitis. Such diagnoses as monomorphic adenoma, myoepithelioma, oncocytoma, neurinoma, benign salivary gland tumor, benign cystic lesion and nonrepresentative cases were considered to have minor or no negative consequences

for the patient. In the second period, we included the diagnostic category “cylindromatous salivary gland tumor.” We used it twice in cases in which numerous globules of metachromatic stroma were present and distinction from ACC was not possible. This category (which includes PA and ACC as the most likely possibilities) is not easy to classify as having a major or minor therapeutic impact. Since the possibility of malignancy was raised cytologically, we considered them major errors.

The FNA cytologic procedure was performed by pathologists using 23- to 25-gauge needles. Air-dried smears were routinely stained with Diff-Quik. When enough material was available, alcohol-fixed smears were obtained and stained by a modified Papanicolaou method. Surgical specimens were processed routinely. When necessary, special histochemical and immunohistochemical studies were performed.

Results

Results in the 2 periods are compared in Tables I–III. Nonrepresentative cases are included as diagnostic errors. Concordant results increased from 88.4–91.2%. Sensitivity rose from 92.6–95.5%. The false negative rate diminished from 7.1–4.5%. Regarding malignancy, false negative diagnoses diminished from 5 to 3 (2 ACC and 1 malignant PA). The second period included no false positive diagnoses of malignancy while the first had 3. A total of 42 errors were present (Tables II and III); 6 of them were nonrepresentative cases. Thirteen of the remaining 36 (36.1%) were considered major errors, while 23 (63.9%) were classified minor errors. Major errors diminished from 8 to 5, while minor errors showed no relevant variation. The most significant reduction in errors occurred in the category of PA showing cystic transformation (from 7 to 2).

Discussion

This study showed that previous experience and knowledge of potential pitfalls increase the diagnostic accuracy of PA. It also showed that there are problematic differential diagnostic areas in which it seems difficult to improve. From the analysis of these results we

Table I Cytohistologic Correlation Study Results

Result	1980–1994	1995–2003	Total
Concordant	175 (88.4%)	211 (91.7 %)	386 (90.2%)
Discordant (FN+FP)	23	19	42
Major error/minor errors	8/15	5/14	13/29
Total no. of biopsies	198	230	428

FN = false negative, FP = false positive.

Table II Cases Erroneously Diagnosed as PA (False Positive)

Cytologic diagnosis	Histologic diagnosis	1980–1994 (n = 9)	1995–2003 (n = 9)	Total (n = 18)
PA	Malignant PA	3	1	4
PA	ACC	1	2	3
PA	Metastatic basal cell carcinoma	1	0	1
PA	Monomorphic adenoma	2	2	4
PA	Myoepithelioma	2	2	4
PA	Oncocytoma	0	1	1
PA	Sialoadenitis	0	1	1

have classified diagnostic errors into 2 groups. The first presented as isolated, sporadic errors with no repetitive pattern. In our series this group included oncocytoma, sialoadenitis, metastatic basal cell carcinoma and neurinoma. Similar errors, as well as others, have been reported in the medical literature.^{6–10} They represent a small percentage of the total number of errors (11.9% in our series). The second, and more important group, concerns those that show a repetitive pattern. These were present in both periods, demonstrating the difficulty in avoiding them. We grouped them into 4 areas: (1) PA, monomorphic adenoma and myoepithelioma; (2) PA with cystic transformation; (3) cylindromatous PA; and (4) malignant or atypical PA. In all those cases of PA in which smears disclosed minimal or no chondromyxoid stroma (“cellular PA”), the possibility of monomorphic adenoma or myoepithelioma must be considered.¹¹ Within this diagnostic area we made no improvements in recent years. These tumors are treated similarly, so the consequences for patient management are minimal. Different authors consider PA, basal cell adenoma and myoepithelioma as a single neoplastic family in which the relative proportions of ductal epithelial cell, myoepithelium and stroma determine into what exact category the tumor falls.¹² From cytology we cannot expect complete sampling of the tumor so minor diagnostic discrepancies within this group are relatively normal.

The second group concerns PA with cystic aspiration. Cystic degeneration and mucin production are common in PA and may result in an erroneous cytologic diagnosis.^{13–17} In this area the number of errors diminished considerably, and 2 simple measures were responsible: first, obtaining numerous smears from the aspirated fluid and, second, reevaluating the lesion and aspirating it again if a residual nodule was palpable.

The third problematic area concerns the cylindromatous presentation of PA. It is well known that PA may resemble ACC cytologically.^{18–20} In our series 3 cases of ACC were misdiagnosed as PA and 1 PA as ACC and no improvement occurred in the second period. Several reports state that neoplastic cells from

ACC tend to be smaller, with a greater tendency to be distributed as monomorphic, naked nuclei. However, in a few cases differentiation can be very difficult. Whenever this is the case, a generic diagnosis of “cylindromatous salivary gland tumor,” considering both possibilities, seems preferable. More rarely, this cytologic pattern can be also seen in monomorphic adenoma, low grade polymorphous adenocarcinoma and myoepithelial carcinoma.^{21–24} Promising immunohistochemical markers for the differentiation between PA and ACC (c-kit and p63) may help to resolve difficult cases.^{25,26} However, the experience on cytologic material is still limited.

Finally, the fourth problem relates to atypia and malignancy in PA. Both the medical literature and our own experience reveal that this is one of the most important problems in the cytologic diagnosis of PA.^{27–29} From a cytologic perspective, adequate sampling and interpretation of atypical changes constitute the major problems. In typical cases, malignant transformation of PA is easily suspected. The patient complains of rapid growth of a preexisting, long-standing tumor. In most of these cases FNA shows cytologic evidence of malignancy. In contrast, malignant transformation may be an unexpected histologic finding in a tumor with no clinical signs of malignant behavior. Usually the malignant area is noninvasive or minimally invasive and involves a limited area of the tumor,

Table III Cases of PA with a Previous Erroneous Cytologic Diagnosis (False Negative)

Cytologic diagnosis	1980–1994 (n = 14)	1995–2003 (n = 10)	Total (n = 24)
ACC	1	0	1
Mucoepidermoid carcinoma	1	0	1
Malignant PA	1	0	1
Sialoadenitis	1	0	1
Cylindromatous tumor	0	2	2
Benign cystic lesion	7	2	9
Nonrepresentative	2	4	6
Benign salivary gland tumor	0	2	2
Neurinoma	1	0	1

which otherwise is benign. If the malignant area is small, there are many reasons that it might not aspirated. In 3 of our false negative cases concerning carcinoma ex-PA, smears showed benign features reflecting that, most probably, the malignant area was not aspirated.

Regarding the interpretation of atypical changes, cellular pleomorphism is particularly common in aspirates from benign PA. It shows features of "degenerative" atypia with a variable number of large nuclei, many of which show no cytoplasm. Necrosis is absent. These atypical cells are usually scarce and are accompanied by numerous benign-looking cells. Malignancy should be considered when atypical cells are abundant and show an abnormal chromatin pattern. Since spontaneous infarction is rare in PA,³⁰ the existence of necrosis is a worrisome feature.

In conclusion, the accuracy of the cytologic diagnosis of PA is high, and the number of major errors may diminish if special attention is paid to some pitfalls. Sampling limitations of the aspiration procedure and interpretative difficulties may prevent differentiation from a few cases of carcinoma ex-PA and ACC, respectively. These few diagnostic errors are difficult to avoid. Trucut or small tissue biopsies will not resolve these problems.

References

- Viguer JM, Vicandi B, Jimenez-Heffernan JA, Lopez-Ferrer P, Limeres MA: Fine needle aspiration cytology of pleomorphic adenoma: An analysis of 212 cases. *Acta Cytol* 1997;41:786-794
- Eneroth CM, Zajizek J: Aspiration biopsy of salivary gland tumors: III. Morphologic studies on smears and histologic sections from 386 mixed tumors. *Acta Cytol* 1966;10:440-454
- Klijanienko J, Viehl P: Fine needle sampling of salivary gland lesions: I. Cytology and histologic correlation of 412 cases of pleomorphic adenoma. *Diagn Cytopathol* 1996;14:195-200
- Verma K, Kapila K: Role of fine needle aspiration cytology in diagnosis of pleomorphic adenoma. *Cytopathology* 2002;13:121-127
- Das DK, Anim JT: Pleomorphic adenoma of salivary gland: To what extent does fine needle aspiration cytology reflect histopathological features? *Cytopathology* 2005;16:65-70
- Mair S, Leiman G: Benign neurilemmoma (schwannoma) masquerading as a pleomorphic adenoma of the submandibular gland. *Acta Cytol* 1989;33:907-910
- Assad L, Treaba D, Ariga R, Bengana C, Kapur S, Bhattacharya B, Reddy VB, Gould VE, Gattuso P, Yana D: Fine-needle aspiration of parotid gland schwannomas mimicking pleomorphic adenoma: A report of two cases. *Diagn Cytopathol* 2004;30:39-40
- Domanski HA: Intravenous pyogenic granuloma mimicking pleomorphic adenoma in a fine needle aspirate: A case report. *Acta Cytol* 1999;43:439-441
- Jiménez-Heffernan JA, Ortega L, Viguer JM: Cytologic features of oncocytic pleomorphic adenoma. *Diagn Cytopathol* 2001;24:147-148
- Saad RS, Takei H, Lipscomb J, Ruiz B: Nodular fasciitis of parotid region: A pitfall in the diagnosis of pleomorphic adenomas on fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2005;33:191-194
- Elsheikh TM, Bernacki EG: Fine needle aspiration cytology of cellular pleomorphic adenoma. *Acta Cytol* 1996;40:1165-1175
- Cheuk KW, Chan JKC: Salivary gland tumors. In *Diagnostic Histopathology of Tumors*. Edited by CDM Fletcher. London, Churchill Livingstone, 2000, pp 231-311
- Stanley MW, Löwhagen T: Mucin production by pleomorphic adenomas of the parotid gland: A cytologic spectrum. *Diagn Cytopathol* 1990;6:49-52
- Nasuti JF, Yu GH, Gupta PK: Fine-needle aspiration of cystic parotid glands lesions: An institutional review of 46 cases with histologic correlation. *Cancer* 2000;90:111-116
- Layfield LJ, Gopez EV: Cystic lesions of the salivary glands: Cytologic features in fine needle aspiration biopsies. *Diagn Cytopathol* 2002;27:197-204
- Brachtel EF, Pilch BZ, Khettry U, Zembovicz A, Faquin WC: Fine-needle aspiration biopsy of a cystic pleomorphic adenoma with extensive adnexa-like differentiation: Differential diagnostic pitfall with mucoepidermoid carcinoma. *Diagn Cytopathol* 2003;28:100-103
- Siddiqui NH, Wu SJ: Fine-needle aspiration biopsy of cystic pleomorphic adenoma with adnexa-like differentiation mimicking mucoepidermoid carcinoma: A case report. *Diagn Cytopathol* 2005;32:229-233
- Orell SR, Sterrett GF, Walters MN-I, Whitaker D: *Manual and Atlas of Fine Needle Aspiration Cytology*. London, Churchill Livingstone, 1999, pp 53-57
- Kapadia SB, Dusenbery D, Dekker A: Fine needle aspiration cytology of pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin cytology. *Acta Cytol* 1997;41:487-492
- Lee SS, Cho KJ, Jang JJ, Ham EK: Differential diagnosis of adenoid cystic carcinoma from pleomorphic adenoma of the salivary gland on fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 1996;40:1246-1252
- Orell SR, Sterrett GF, Walters MN-I, Whitaker D: *Manual and Atlas of Fine Needle Aspiration Cytology*. London, Churchill Livingstone, 1999, pp 57-58
- Carrillo R, Poblet E, Rocamora A, Rodriguez-Peralto JL: Epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary gland: Fine-needle aspiration cytologic findings. *Acta Cytol* 1990;34:243-247
- Miliauskas JR, Orell SR: Fine needle aspiration cytological findings in five cases of epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary glands. *Diagn Cytopathol* 2003;28:163-167
- Klijanienko J, Viehl P: Salivary gland with papillae: Cytology and histology analysis of polymorphous low-grade adenocarcinoma and papillary cystadenocarcinoma. *Diagn Cytopathol* 1998;19:244-249
- Mino M, Pilch BZ, Faquin WC: Expression of KIT (CD117) in neoplasms of the head and neck: An ancillary marker for adenoid cystic carcinoma. *Mod Pathol* 2003;16:1224-1231
- Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD: Assessment of p63 expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and basal cell and canalicular adenomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:613-619
- Klitz B, Pitman MB: Carcinoma ex pleomorphic adenoma of

- the parotid gland: Pitfalls in fine needle aspiration biopsy diagnosis (abstr). *Acta Cytol* 1994;38:855
28. Klijanienko J, El-Naggar AK, Vielh P: Fine-needle sampling findings in 26 carcinomas ex pleomorphic adenomas: Diagnostic pitfalls and clinical considerations. *Diagn Cytopathol* 1999; 21:163-166
29. Nigam S, Kumar N, Jain S: Cytomorphologic spectrum of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Acta Cytol* 2004;48:309-314
30. Behzatoglu K, Bahadir B, Hug GE, Kaplan HH: Spontaneous infarction of a pleomorphic adenoma in parotid gland: Diagnostic problems and review. *Diagn Cytopathol* 2005;32:367-369

APARTADO 3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE PAAF DE ADENOMA PLEOMÓRFICO EN 221 PACIENTES DURANTE EL TERCER PERIODO 2004-2011. (GRUPO 3)

Este trabajo corresponde al objetivo 3.

Durante este tercer periodo, contamos con un total de 221 pacientes con PAAF diagnóstica de AP. Obtuvimos biopsias en 194 casos. De estos, en 185 casos los diagnósticos de PAAF fueron concordantes con la biopsia (95,36%) y en 9 casos (4,63%) se hicieron falsos diagnósticos positivos de AP correspondiendo en la biopsia a: AP maligno: 2 casos; C.A.Q.: 2 casos; adenoma de células basales: 3 casos; y mioepitelioma: 2 casos, según se recoge en la Tabla 7.

Por otra parte contamos con 11 pacientes con diagnóstico en biopsia de AP y PAAF previa con los siguientes diagnósticos citológicos: AP maligno: 1 caso; tumor cilindromatoso: 2 casos; lesión quística benigna: 1 caso; no representativo: 3 casos; tumor benigno primario de glándula salival 4 casos, según se recoge en la Tabla 8.

Con estos resultados la sensibilidad (VP/VP+FN) de la prueba en este Grupo 3 es de 94,38% y la especificidad (VN/VN+FP) es de 96,48%.

APARTADO 4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DIAGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS EN LOS TRES PERIODOS

Este trabajo corresponde al objetivo 3.

Durante el primer periodo desde 1980 a 1994, 212 pacientes fueron sometidos a PAAF con diagnóstico citológico o histológico de AP. De estos, se obtuvo biopsia en 184 casos [(175+9 (VP+FP)]. Por otra parte tenemos biopsias de 14 pacientes con diagnóstico histológico de AP y otro diferente en la citología (FN), haciendo un total de 198 biopsias.

En el segundo periodo desde 1995 a 2003, el número de pacientes fue de 244. Obtuvimos biopsias en 220 casos [(211+9 (VP+FP)]. Por otra parte tenemos otros 10

pacientes con diagnóstico histológico de AP y otro diferente en la citología (FN), con un total de 230 biopsias.

En el tercero y último periodo, 2004-2011 contamos con un total de 221 pacientes. Obtuvimos biopsias en 194 casos [(185+9 (VP+FP)) y además otros 11 pacientes con biopsia de AP y otro diagnóstico citológico (FN), con un total de 205 biopsias.

Los diagnósticos falsos positivos y falsos negativos de los tres periodos se recogen en las Tablas 7 y 8 respectivamente.

D.CITOLÓGICO	D. HISTOLÓGICO	1980-1994	1995-2003	2004-2011
AP	AP MALIGNO	3	1	2
AP	C.A.Q.	1	2	2
AP	Ca C.BASALES	1	0	0
AP	ADENOMA DE C. BASALES	2	2	3
AP	MIOEPITELIOMA	2	2	2
AP	ONCOCITOMA	0	1	0
AP	SIALOADENTITIS	0	1	0

Tabla 7. Casos erróneamente diagnosticados de AP (falsos positivos).

D.CITOLÓGICO	1980-1994	1995-2003	2004-2011
C.A.Q.	1	0	0
Ca. MUCOEPIDERMÓIDE	1	0	0
AP MALIGNO	1	0	1
SIALOADENTITIS	1	0	0
TUMOR CILINDROMATOSO	0	2	2
LESIÓN QUÍSTICA BENIGNA	7	2	1
NO REPRESENTATIVO	2	4	3
TUMOR BENIGNO DE GLÁNDULA SALIVAL	0	2	4
NEURINOMA	1	0	0

Tabla 8. Casos de AP en biopsia con un diagnóstico citológico previo erróneo (falsos negativos).

El número de diagnósticos concordantes y discordantes entre biopsia y citología en los tres periodos se expresan en la Tabla 9.

En total contamos con 633 pacientes con biopsia y diagnóstico citológico de AP incluyendo los falsos diagnósticos positivos citológicos de AP (606 casos concordantes y 27 casos FP), y 35 biopsias más de pacientes con diagnóstico de biopsia de AP y otro diagnóstico citológico. Estos datos quedan así mismo reflejados en la Tabla 9.

RESULTADOS	1980-1994	1995-2003	2004-2011
CONCORDANTES	175 (88.4 %)	211 (91.7 %)	185 (89,80 %)
DISCORDANTES (FP+FN)	23 (9+14)	19 (9+10)	20 (9+11)
Nº TOTAL DE BIOPSIAS	198	230	205

Tabla 9. Punciones diagnosticadas de AP realizadas desde 1980 hasta 2011 inclusive.

En la tabla de contingencia número 10 expresamos los valores correspondientes a las citologías en relación al “gold estándar” que son las biopsias, quedando reflejados los diagnósticos citológicos FP y FN así como los VP y VN

BIOPSIA				
CITOLOGÍA		POSITIVA	NEGATIVA	TOTAL
	POSITIVA	571	27	598
	NEGATIVA	35	1654	1689
	TOTAL	606	1681	2287

Tabla 10. Correlación cito-histológica de los casos diagnosticados por PAAF de AP.

Según los valores de la Tabla 10 los datos estadísticos son:

Sensibilidad: 94,22%.

Especificidad: 98,39%.

VPP: 95,48%.

VPN: 97,92%.

APARTADO 5. EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES EPITELIALES Y MIOEPITELIALES

Expresión de los marcadores IHQ en la glándula salival normal

Este trabajo corresponde al objetivo 4.

En 36 de los 40 casos se reconoció glándula salival normal. En todos ellos los resultados fueron semejantes. La CK19 marcó con intensidad los acinos y los conductos intercalares, estriados y excretores. Las células mioepiteliales de los acinos y conductos intercalares, así como las células basales de los conductos estriados y excretores mostraron inmunotinción con p63. Así mismo, el mioepitelio mostró immunoexpresión positiva con calponina. La tinción de PAGF resultó negativa así como el WT1, siendo este último positivo solo en las células endoteliales de las estructuras vasculares del tejido conectivo (Fig. 33).

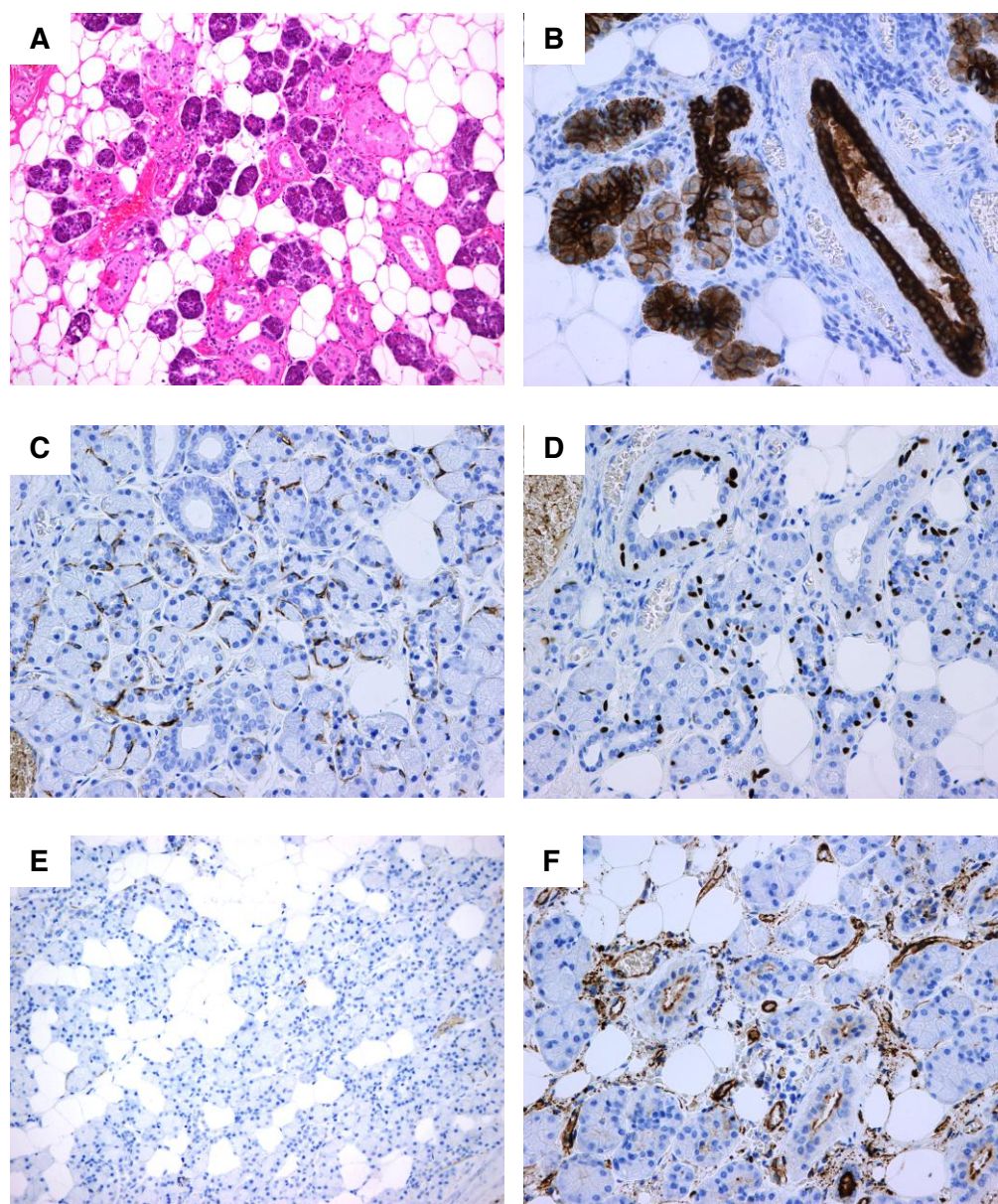


Figura 33. (A) H/E de una glándula salival normal. (B) Tinción positiva con CK19 de acinos, conductos intercalares y excretorios. (C) Tinción del mioepitelio con calponina. (D) Tinción del mioepitelio o células basales con p63. (E) Ausencia de inmunotinción con PAGE. (F) Inmunotinción positiva en las células endoteliales de estructuras vasculares del tejido conectivo con WT1.

Expresión de los marcadores IHQ en biopsias de AP

Inmunoexpresión en zonas parecidas a mioepitelio

Las áreas lumbinales expresaron de forma intensa y difusa CK19. Las áreas paralumbinales o parecidas a mioepitelio se marcaron intensamente con p63 y WT1, en

este último caso con tinción citoplasmática. La inmunoexpresión de calponina y PAGF en estas áreas fue moderada (Fig. 34).

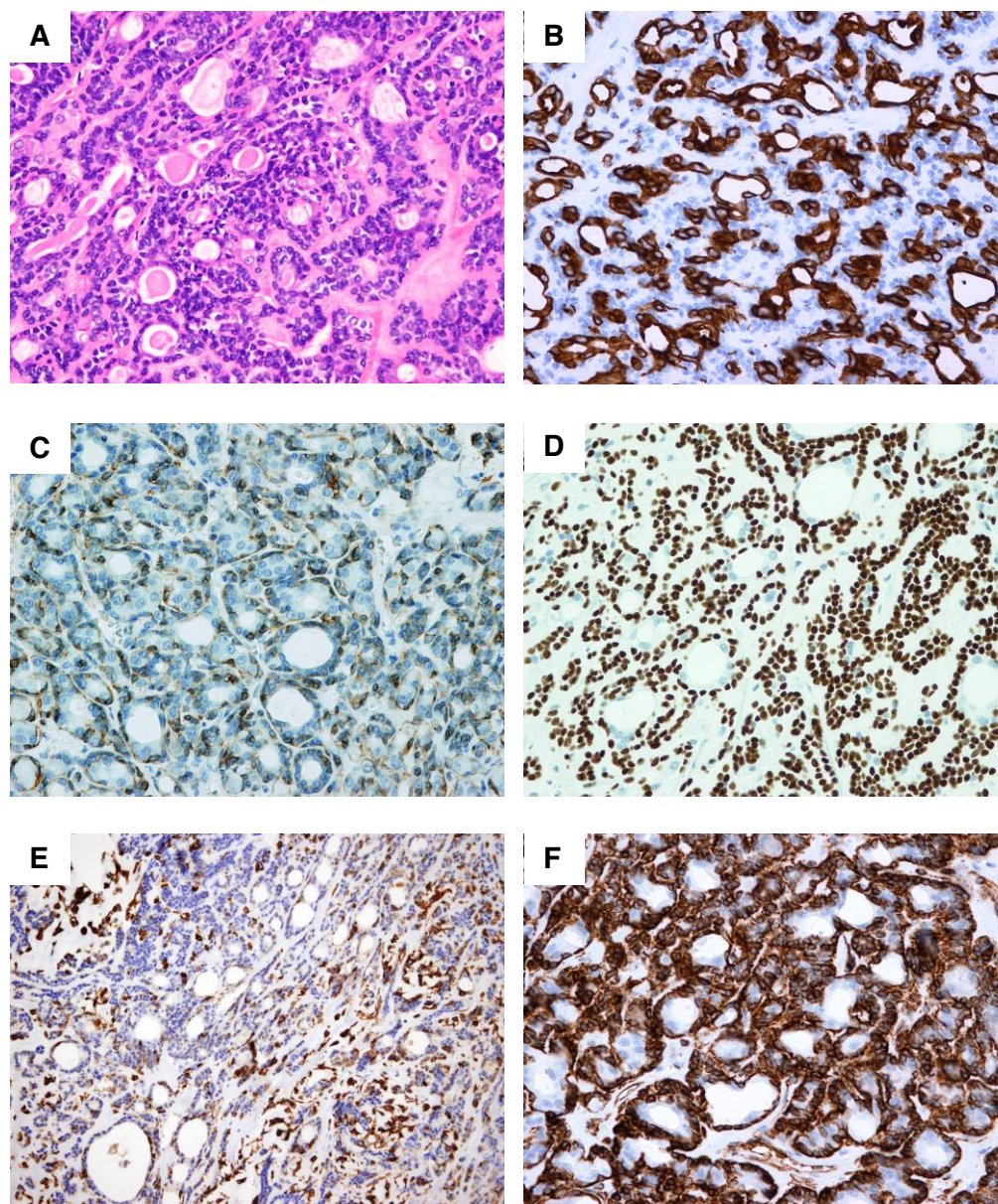


Figura 34. (A) H/E imagen de un AP con diferenciación luminal y paraluminal. (B) Intensa expresión luminal con CK19. (C) Moderada positividad paraluminal con calponina. (D) Intensa inmunotinción con p63. (E) Moderada inmunotinción con PAGF. (F) Intensa expresión con WT1 de localización citoplasmática.

Dentro de la clasificación de zonas parecidas a mioepitelio se identifica el mioepitelio fusiforme. En nuestra experiencia es la calponina el mejor marcador para este tipo de mioepitelio, siendo intensamente positivo (Fig. 35).

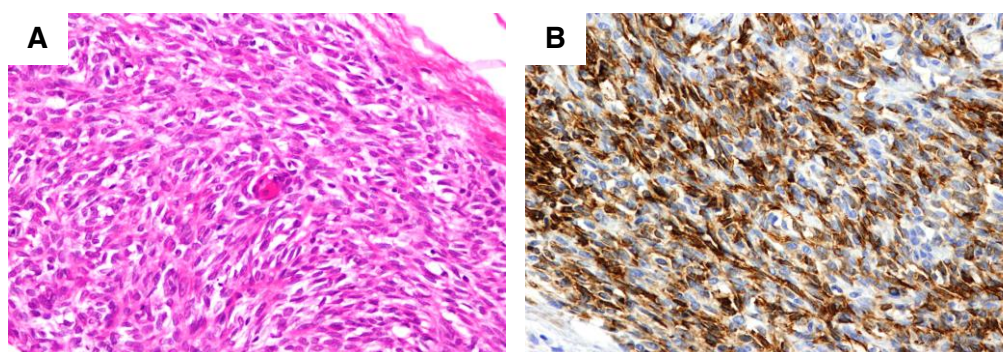


Figura 35. (A) H/E de células fusiformes parecidas a mioepitelio en el AP. (B) Intensa inmunotinción de estas células con la calponina.

Immunoexpresión en el mioepitelio modificado mixoide

El mioepitelio modificado mixoide se marcó intensamente con PAGEF y WT1 citoplasmática (Fig. 36). Así mismo, se identificó positividad con WT1 en las áreas plasmocitoides (Fig. 37). Con este último marcador también se reconoce positividad en las zonas periféricas que delimitan este mioepitelio. Estas áreas periféricas también se marcan con p63. La inmunotinción con calponina tanto en las áreas de mioepitelio modificado como en las periféricas resultó negativa. (Figs. 38).

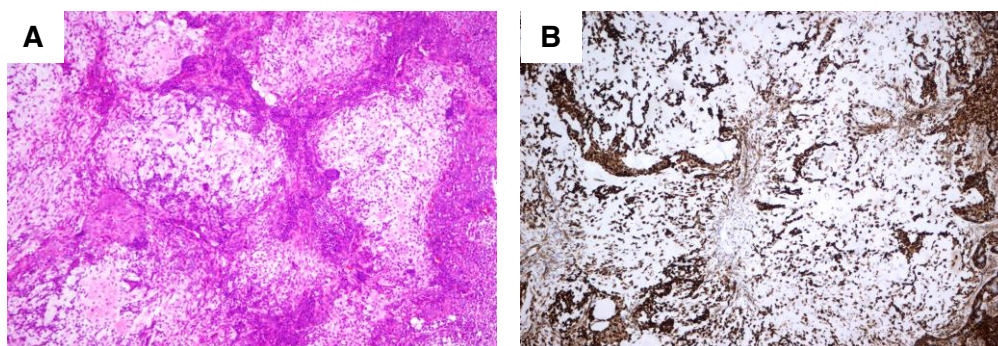


Figura 36. (A) Detalle de las áreas condromixoides con H/E. (B) Destaca la intensa inmunotinción con WT1.

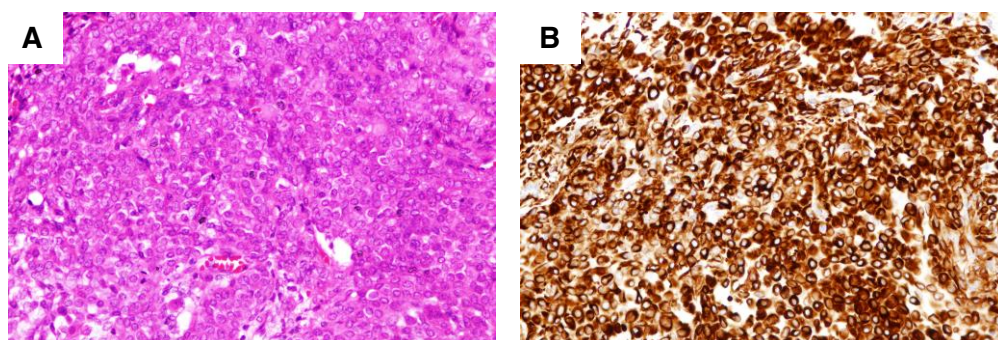


Figura 37. (A) H/E de células plasmocitoides, pertenecientes al grupo de mioepitelio modificado. (B) Intensa inmunotinción con WT1.

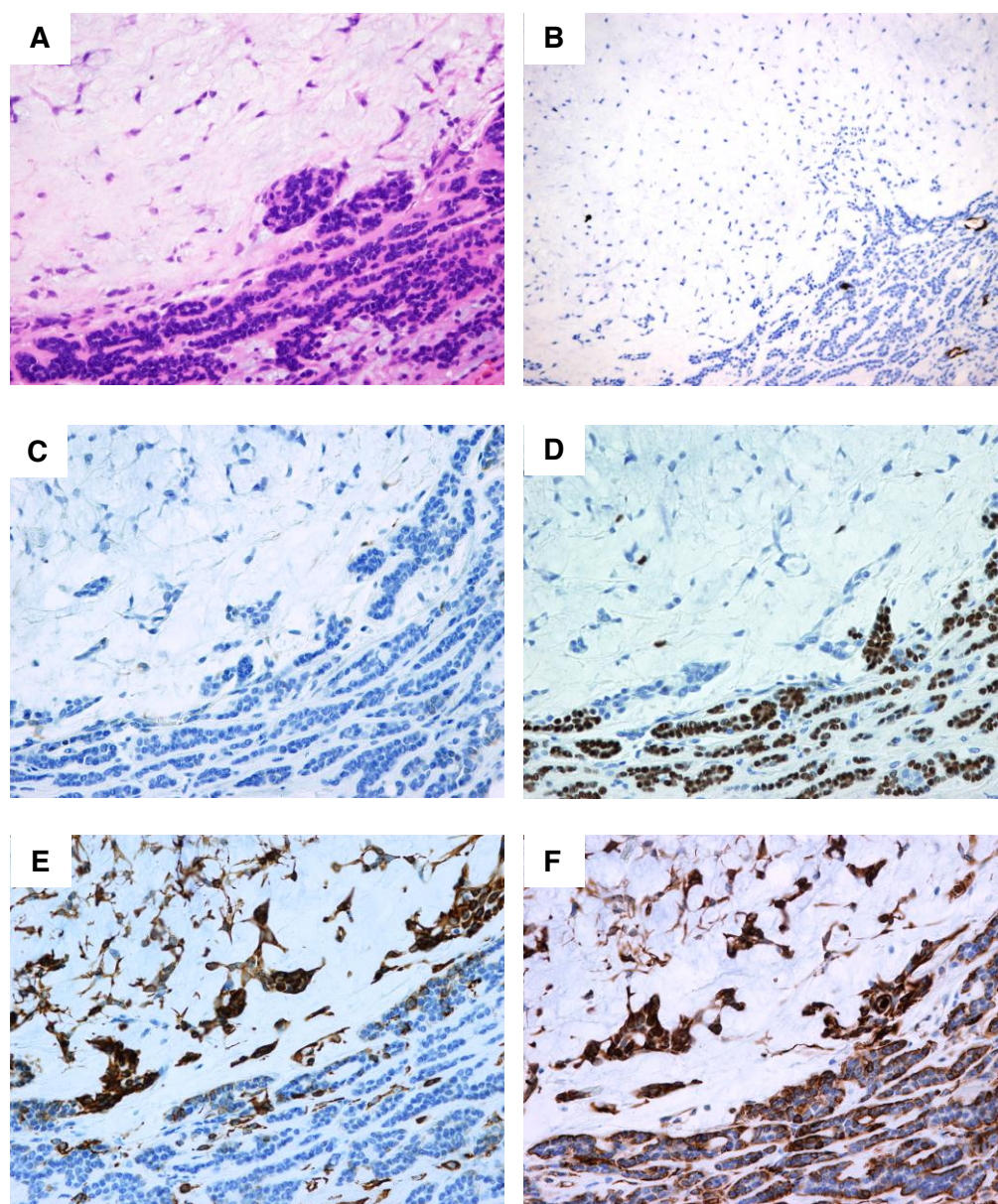


Figura 38. (A) Mioepitelio modificado mixoide con H/E. (B) Ausencia de CK19. (C) Ausencia de calponina. (D) Débil positividad con p63. (E) Intensa positividad con PAGF. (F) Expresión citoplasmática de WT1.

Inmunoexpresión en el mioepitelio modificado condroide

En las áreas condroides de mioepitelio modificado solo la inmunotinción con PAGF resultó positiva. Sin embargo, las áreas de mioepitelio circundante al modificado expresaron intensamente WT1 y de manera más focal PAGF y p63 (Fig. 39).

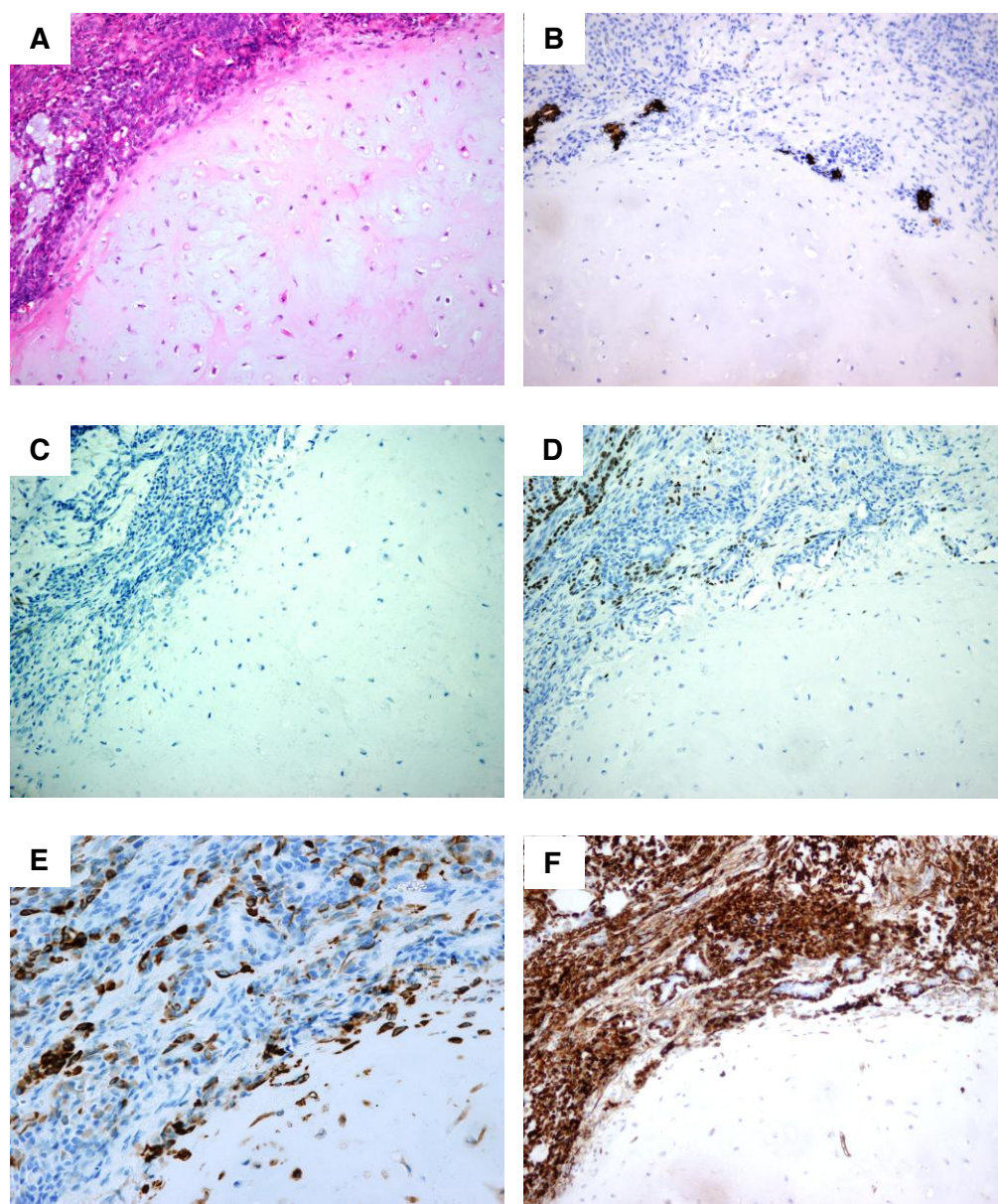


Figura 39. (A) Zona de mioepitelio modificado condroide con H/E. (B) Muy discreta positividad para las zonas celulares paracondroides con CK19. (C) Negatividad para calponina. (D) Ausencia de expresión de p63. (E) Positividad para PAGF. (F) Positividad muy intensa, sobre todo en las áreas paracondroides, con WT1.

Inmunoexpresión en el mioepitelio transformado epiteliode

En las áreas de mioepitelio transformado de tipo epiteliode se observaron unos resultados semejantes a las áreas de tipo basaloide, excepto la negatividad de p63. Destacó la intensa inmunoexpresión con WT1 (Fig. 40).

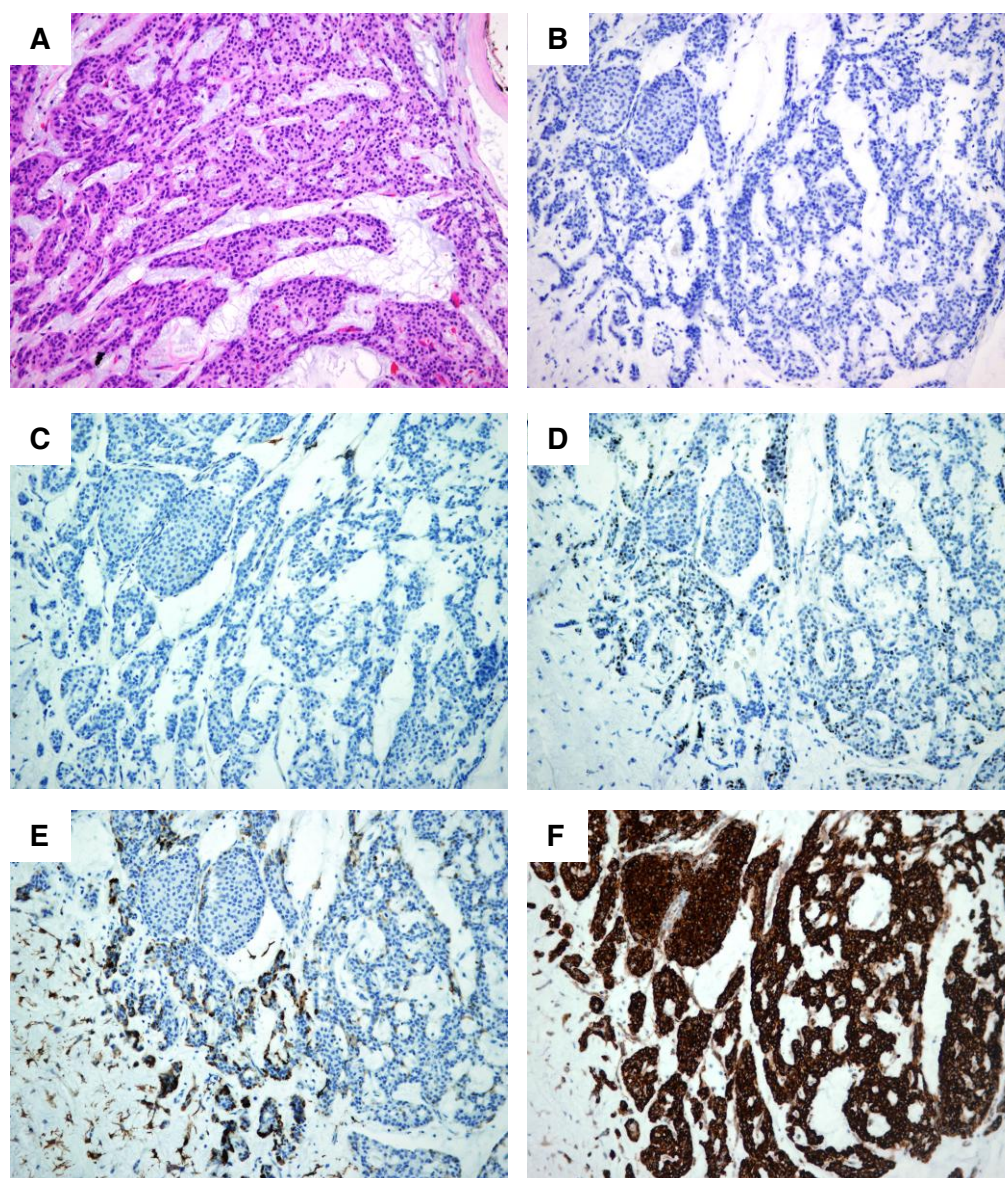


Figura 40. (A) Área de mioepitelio transformado epitelioides con H/E. (B) Escasa tinción con CK19, (C) con calponina y (D) con p63. (E) Moderada tinción, sobre todo en las áreas mixoides, con WT1. (F) Intensa positividad con WT1.

Inmunoexpresión en el mioepitelio transformado escamoso

En las áreas escamosas del mioepitelio transformado destaca la marcada positividad para CK19 y, a diferencia de lo esperado, tan solo se observa una positividad débil y focal para p63 (Fig. 41).

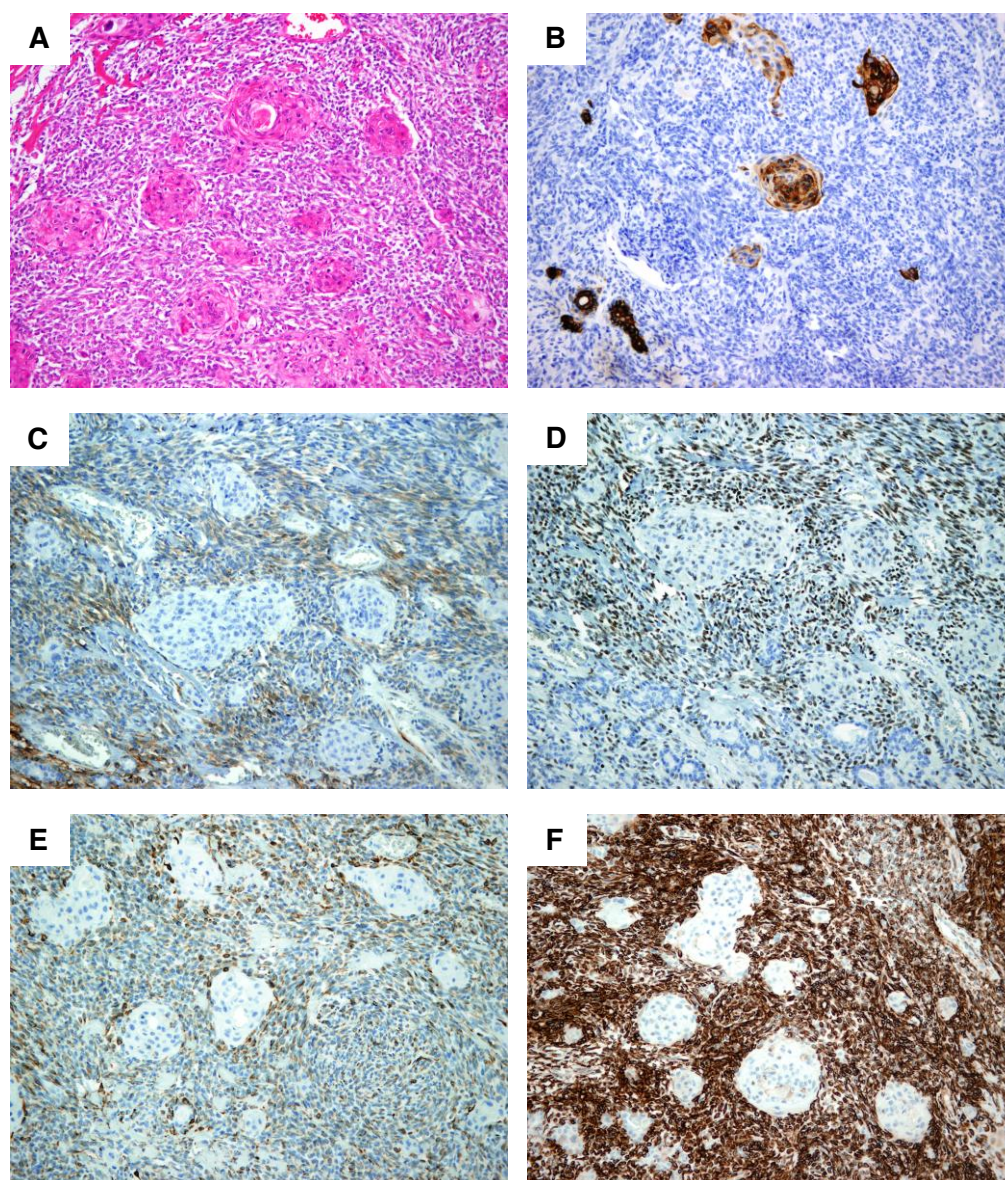


Figura 41. (A) Mioepitelio transformado escamoso con H/E. (B) Tinción positiva con CK19 en los nidos escamosos. (C) Moderada positividad en el componente periescamoso con calponina, (D) con p63 y (E) con PAGF. (F) Intensa positividad con WT1.

Inmunoexpresión en el mioepitelio transformado cribiforme

El estudio inmunohistoquímico de las áreas cribiformes mostró una marcada expresión de marcadores mioepiteliales (p63 y WT1). Destacó la presencia de abundantes células mioepiteliales que no parecían ser tan numerosas en el estudio con H/E, así como la escasa representación de las células epiteliales puestas de manifiesto con CK19. En las áreas con este patrón, el mioepitelio fue marcadamente positivo con p63 y WT1. Sin embargo tanto la calponina como la PAGF fueron negativas (Fig. 42).

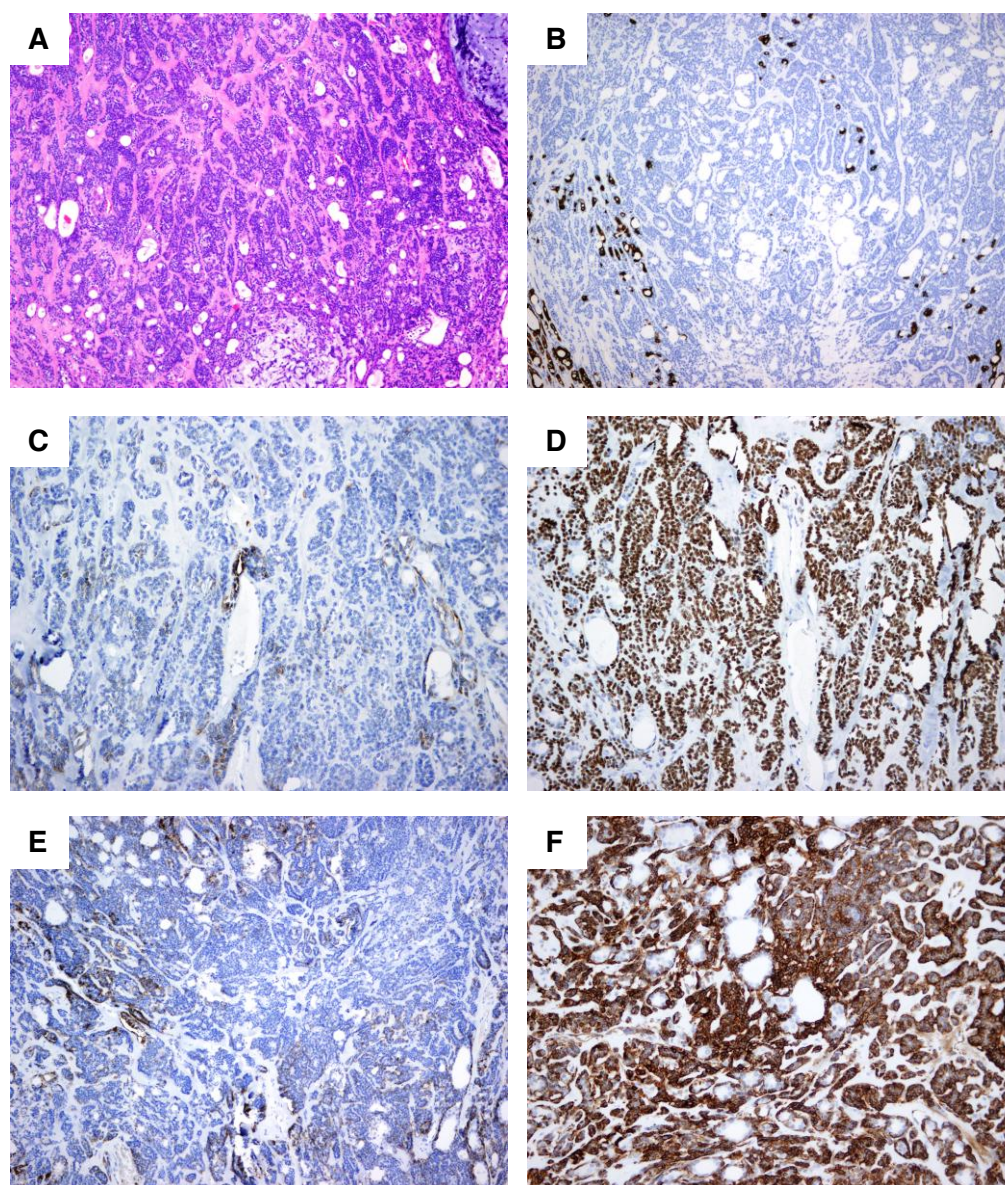


Figura 42. (A) Área de mioepitelio transformado basaloide. (B) Escasa tinción con CK19. (C) Apenas se identifica positividad con calponina. (D) Positividad intensa con p63. (E) Ligera expresión de PAGF y (F) intensa con WT1.

APARTADO 6. VALORACIÓN CUANTITATIVA DE LOS MARCADORES EPITELIALES Y MIOEPITELIALES EN BIOPSIA DE AP

Inmunoexpresión de CK19

El porcentaje de zonas parecidas a mioepitelio, de mioepitelio modificado y de mioepitelio transformado, en los 40 casos estudiados con H/E, y el porcentaje de tinción con CK19 en áreas parecidas a mioepitelio se recogen en la Tabla 11.

Nº Caso	H/E					CK19
	Parecido a mioepitelio	Mioepitelio modificado	Mioepitelio transformado			Biopsia
	%	%	Epitelioide %	Escamoso %	Cribiforme %	% a
1	60	30			10	3
2	50	20			30	3
3	30	65		5		2
4	10	80	10			1
5		80	20			0
6	5	60	30	5		1
7	10	50	30		10	1
8		90			10	0
9	30		70			3
10	60	40				3
11	30	70				3
12		100				0
13	20	80				1
14	90	10				3
15	30	30		10	30	2
16	60	30	10			3
17		100				0
18		90			10	0
19		95			5	0
20		80			20	0
21	80			20		3
22	5	80			15	0
23		60	10		30	0 b
24	10	70			20	1
25		80			20	0
26	70	30				3
27	80	20	Excretores.			3
28	80	20				3
29		60	10		30	0
30		80			20	0
31	10	90				1
32		70			30	0
33		80			20	0
34	10	80			10	1
35	80	20				3
36	10	90				1
37	30	70				2
38	20	80				2
39		80			20	0
40	90	10				3

Tabla 11. Porcentaje de los diferentes tipos de mioepitelio evaluado en biopsias de AP con H/E. Valoración de CK 19. (a) 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. La intensidad fue de +++. (b) único caso CK19 negativo con presencia de áreas parecidas a mioepitelio aunque con solo un 5%.

Existe una clara relación entre el porcentaje de células teñidas con la CK19 y el porcentaje de zonas parecidas a mioepitelio de la preparación. A mayor porcentaje de zonas parecidas a mioepitelio mayor porcentaje de inmunotinción con esta

citoqueratina. Así, en 11 de los 13 casos en los que la CK19 alcanzaba la puntuación de 3, al menos el 50% del tumor presentaba áreas parecidas a mioepitelio, y por el contrario, en los 27 casos restantes, las áreas de mioepitelio o eran inexistentes o alcanzaban un máximo del 30%. Las áreas morfológicamente cribiformes o basaloides no mostraron inmunotinción con CK19.

En la Tabla 12 resumimos la inmunotinción expresada por CK19 en los diferentes tipos de mioepitelio.

Tipo celular	Casos	CK19			
	40	0	1	2	3
Parecido a mioepitelio	26	1	8	4	13
Mioepitelio modificado	38	0	0	0	0
Mioepitelio transformado					
Epitelioide	8	0	0	0	0
Escamoso	4	0	0	0	0
Cribiforme	18	0	0	0	0

Tabla 12. Tinción de CK19 en las distintas zonas del AP, siendo positiva la tinción en las áreas parecidas a mioepitelio.

Inmunoexpresión de calponina

El porcentaje e intensidad de tinción con calponina de zonas parecidas a mioepitelio, de mioepitelio modificado y de mioepitelio transformado en los 40 casos estudiados con H/E se expresan en la Tabla 13.

Nº Caso	Calponina									
	Parecido a mioepitelio		Mioepitelio modificado		Mioepitelio transformado					
					Epitelioide %		Escamoso %		Cribiforme %	a
	%		%							
1	60	2 ++	30	2 ++					10	0
2	50	1 ++	20	1 ++					30	0
3	30	0	65	2 ++			5	0		
4	10	2 ++	80	0	10	0				
5			80	0	20	0				
6	5	0	60	0	30	0	5	0		
7	10	0	50	1 ++	30	0			10	0
8			90	1 ++					10	0
9	30	0			70	2 ++				
10	60	0	40	1 ++						
11	30	0	70	1 +						
12			100	0						
13	20		80	2 ++						
14	90	2 +++	10	2 +++						
15	30	1 +++	30				10	0	30	0
16	60	3 +++	30	2 +++	10	1 ++				
17			100	0						
18			90	0					10	0
19			95	0					5	1 ++
20			80	0					20	2 ++
21	80	3 +++					20	0		
22	5	3 +++	80	0					15	1 +++
23			60	2 +++	10	2 +++			30	2 +++
24	10	0	70	0					20	2 +++
25			80	0					20	2 +++
26	70	0	30	0						
27	80	0	20	1 +++						
28	80	2 +++	20	1 +++						
29			60	0	10	0			30	0
30			80	0					20	1 +++
31	10	0	90	1 +						
32			70	0					30	0
33			80	0					20	1 +++
34	10	1 +	80	0					10	3 +++
35	80	1 ++	20	0						
36	10	2 +++	90	1 +						
37	30	0	70	1 ++						
38	20	1 +++	80	3 +++						
39			80						20	0
40	90	0	10							

Tabla 13. Porcentaje e intensidad de inmunoexpresión de calponina en biopsias de AP. a: 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. +, ligera. ++, moderada. +++, intensa.

La calponina tiene un moderado porcentaje de inmunotinción, en las áreas parecidas a mioepitelio de morfología fusiforme, con una fuerte intensidad. La mayor positividad la expresan las áreas de mioepitelio modificado, mixoide condroide y plasmocitoide. En las áreas de mioepitelio transformado la inmunotinción resultó más positiva en los focos cribiformes.

Inmunoexpresión de p63

El porcentaje e intensidad de tinción con p63 de zonas parecidas a mioepitelio, de mioepitelio modificado y de mioepitelio transformado en los 40 casos estudiados con H/E se expresan en la Tabla 14.

Nº Caso	p63									
	Parecido a mioepitelio		Mioepitelio modificado		Mioepitelio transformado					
	%		%		Epiteliode %		Escamoso %		Cribiforme %	a
1	60	3 +++	30	3 +++					10	3 +++
2	50	3 +++	20	1 +++					30	3 +++
3	30	2 +++	65	2 ++			5	1 ++		
4	10	3 +++	80	0	10	0				
5			80	0	20	0				
6	5	3 ++	60	1 ++	30	0	5	0		
7	10	0	50	0	30	1 +			10	0
8			90	2 +++					10	1
9	30	3 +++			70	2 ++				
10	60	3 +++	40	0						
11	30	1 +++	70	0						
12			100	2+++						
13	20	3 +++	80	2 +++						
14	90	3 +++	10	1 +++						
15	30	2 +++	30	1 +++			10	0	30	0
16	60	3 +++	30	1 +++	10	2 ++				
17			100	0						
18			90	0					10	0
19			95	0					5	3 +++
20			80	3 +++					20	2 +++
21	80	3 +++					20	1 ++		
22	5	1 +++	80	0					15	2 +++
23			60	0	10	0			30	1 ++
24	10	1 +++	70	1 ++					20	2 ++
25			80	2 +++					20	1 +++
26	70	3 +++	30	0						
27	80	0	20	0						
28	80	2 +++	20	0						
29			60	0	10	0			30	0
30			80	0					20	1 +++
31	10	0	90	1 +++						
32			70	0					30	1 +++
33			80	2 +++					20	2 +++
34	10	0	80	0					10	2 +++
35	80	3 ++	20	0						
36	10	0	90	2 ++						
37	30	3 +++	70	0						
38	20	1 ++	80	3 ++						
39			80	2 +++					20	1 +++
40	90	3 +++	10	2 +++						

Tabla 14. Porcentaje e intensidad de inmunoexpresión de p63 en biopsias de AP. a: 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. +, ligera. ++, moderada. +++, intensa.

En lo que respecta a la p63 también se marcan con un porcentaje mayor las áreas parecidas a mioepitelio y las áreas cribiformes, que el resto de las áreas de mioepitelio modificado y transformado. Llama la atención que en las zonas escamosas solo 2 casos presentan una débil tinción.

Inmunoexpresión de PAGF

El porcentaje e intensidad de tinción con PAGF de zonas parecidas a mioepitelio, de mioepitelio modificado y de mioepitelio transformado en los 40 casos estudiados con H/E se expresan en la Tabla 15.

Nº Caso	PAGF									
	Parecido a mioepitelio		Mioepitelio modificado		Mioepitelio transformado					
	%	a	%	a	Epitelioide %	a	Escamoso %	a	Cribiforme %	a
1	60	3 +++	30	3 +++					10	2 ++
2	50	1 ++	20	3 +++					30	0
3	30	2 ++	65	2 ++			5	0		
4	10	3 +++	80	3 +++	10	1 +				
5			80	3 +++	20	1 +				
6	5	0	60	3 +++	30	1 ++	5	0		
7	10	3 +++	50	3 +++	30	1 +			10	0
8			90	3 +++					10	3 +++
9	30	1 +			70	0				
10	60	2 ++	40	3 +++						
11	30	1 +	70	3 +++						
12			100	3 +++						
13	20	2 +	80	3 +++						
14	90	3 +++	10	3 +++						
15	30	0	30	3 +++			10	0	30	0
16	60	3 +++	30	3 +++	10	0				
17			100	3 +++						
18			90	3 +++					10	3 +++
19			95	3 +++					5	3 +++
20			80	3 +++					20	3 +++
21	80	3 +++					20	0		
22	5	3 +++	80	3 +++					15	2 +++
23			60	1 +++	10	0			30	0
24	10	0	70	3 +++					20	3 +++
25			80	3 +++					20	3 +++
26	70	3 +++	30	3 +++						
27	80	2 +++	20	3 +++						
28	80	3 +++	20	3 +++						
29			60	1 +++	10	1 +			30	1 ++
30			80	3 +++					20	3 +++
31	10	2 +++	90	3 +++						
32			70	3 +++					30	3 +++
33			80	3 +++					20	3 +++
34	10	3 +++	80	3 +++					10	3 +++
35	80	3 +++	20	3 +++						
36	10	1 +++	90	2 +++						
37	30	1 +++	70	0						
38	20	2 +++	80	2 +++						
39			80	2 +++					20	2 +++
40	90	2 +++	10	2 +++						

Tabla 15. Porcentaje e intensidad de inmunoexpresión de PAGF en biopsias de AP.
(a) 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. +, ligera.
++, moderada. +++, intensa.

Con PAGF destaca una positividad intensa o difusa en el mioepitelio modificado, en 36 de 37 casos. También se observó una positividad difusa o intensa en más del 75% en las áreas parecidas a mioepitelio. En el mioepitelio transformado los resultados fueron más variables, observándose una positividad intensa o difusa en el 66% de los casos con áreas cribiformes. Las zonas epitelioides mostraron una positividad débil o focal, o resultaron negativas. Las áreas escamosas no mostraron inmunotinción.

Inmunoexpresión de WT1

El porcentaje e intensidad de tinción con WT1 en zonas parecidas a mioepitelio, de mioepitelio modificado y de mioepitelio transformado en los 40 casos estudiados de AP se recogen en la Tabla 16.

Nº Caso	WT1									
	Parecido a mioepitelio		Mioepitelio modificado		Mioepitelio transformado					
	%	a	%	a	Epiteliode %	a	Escamoso %	a	Cribiforme %	a
1	60	3 +++	30	3 +++					10	3 +++
2	50	3 +++	20	3 +++					30	3 +++
3	30	3 +++	65	3 +++			5	0		
4	10	3 +++	80	3 +++	10	3 +++				
5			80	3 +++	20	3 +++				
6	5	N.V.	60	3 +++	30	3 +++	5	0		
7	10	3 +++	50	3 +++	30	3 +++			10	3 +++
8			90	3 +++					10	3 +++
9	30	3 +++			70	3 +++				
10	60	3 +++	40	3 +++						
11	30	3 ++	70	3 +++						
12			100	3 +++						
13	20	3 +++	80	3 +++						
14	90	3 +++	10							
15	30	3 +++	30	3 +++			10	3 +++	30	3 +++
16	60	3 +++	30	3 +++	10	0				
17			100	3 +++						
18			90	3 +++					10	3 +++
19			95	3 +++					5	3 +++
20			80	3 +++					20	3 +++
21	80	3 +++					20	0		
22	5	1 +++	80	3 +++					15	3 +++
23			60	3 +++	10	0			30	3 +++
24	10	1 +++	70	3 +++					20	3 +++
25			80	3 +++					20	3 +++
26	70	3 +++	30	3 +++						
27	80	3 +++	20	3 +++						
28	80	3 +++	20	3 +++						
29			60	3 +++	10	0			30	3 +++
30			80	3 +++					20	3 +++
31	10	3 +++	90	3 +++						
32			70	3 +++					30	3 +++
33			80	3 +++					20	3 +++
34	10	3 +++	80	3 +++					10	3 +++
35	80	3 +++	20	3 +++						
36	10	3 +++	90	3 +++						
37	30	3 ++	70	3 +++						
38	20	3 +++	80	3 +++						
39			80	3 +++					20	3 +++
40	90	3 +++	10	3 +++						

Tabla 16. Porcentaje e intensidad de inmunoexpresión de WT1 en biopsias de AP.
(a) 0=ninguna célula teñida; 1=<10%; 2=10-50%; 3=50-100%. +, ligera.
++, moderada. +++, intensa

La inmunotinción con el WT1 es intensa o difusa en la mayor parte de los casos, especialmente en las áreas parecidas a mioepitelio, mioepitelio modificado y áreas cribiformes.

De tal manera, que en la totalidad de los casos, en las áreas de mioepitelio modificado y cribiforme, y en 20 de 24 casos en las áreas parecidas a mioepitelio se observó una inmunotinción intensa o difusa.

En las áreas epitelioides y escamosas los resultados fueron más variables. Así en 3 de 7 casos en los que se reconoció un patrón epiteliode, no se observó tinción con WT1 y en los cuatro restantes la inmunotinción alcanzó la puntuación de 3. El patrón escamoso, que solo se identificó en 4 casos, fue el que mostró una menor positividad, con un único caso con puntuación de 3 y con negatividad en los 3 restantes.

En la Tabla 17 se expresa el resumen de los distintos marcadores IHQ, realizados en las 40 biopsias de AP.

Tipo celular	Casos	Calponina				p63				PAGF				WT1			
	40	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Parecido a mioepitelio	26	13	5	5	3	7	2	3	14	8	4	4	10	1	2	0	23
Mioepitelio modificado	38	19	12	6	1	19	7	9	3	1	1	5	31	1	0	0	37
Mioepitelio transformado																	
Epiteliode	8	5	1	2	0	5	1	2	0	3	5	0	0	3	0	0	5
Escamoso	4	4	0	0	0	2	2	0	0	4	0	0	0	3	0	0	1
Cribiforme	18	9	4	4	1	6	5	4	3	4	1	3	10	0	0	0	18

Tabla 17. Resumen de los resultados de la inmunohistoquímica (calponina, p63, PAGF y WT1) en los 40 casos de biopsias.

APARTADO 7. EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOCITOQUÍMICOS EN PAAF DE AP

Este estudio corresponde al objetivo 5.

Como es sabido el aspecto morfológico del AP, desde el punto de vista de la citología, es diferente si se observa con la técnica de Diff-Quik o de Papanicolaou. Con el Diff-Quik destaca la matriz condromixioide del AP y con el Papanicolaou toma mayor relevancia el componente celular. En lo que respecta a los distintos marcadores ICQ queremos resaltar que, habiendo realizado la inmunotinción con calponina en 7

casos y resultando en todos ellos negativa, desestimamos el seguir utilizando este anticuerpo como marcador mioepitelial en las punciones del AP.

En la Fig. 43 mostramos un AP de predominio celular en histología con su componente celular que expresa CK19. La inmunotinción con CK19 la realizamos en 19 casos de PAAF. En 17 no se identificó CK19. El caso de AP de predominio celular resultó positivo con una valoración de 2 y otro caso de predominio mixto resultó positivo con una valoración de 1 (Fig. 43).

Sin embargo el componente plasmocitoide y fusiforme mioepitelial claramente expresó inmunotinción tanto para PAGF como para WT1 (Fig. 44).

A pesar de las grandes dificultades que hemos tenido en la puesta a punto de la técnica de inmunotinción con PLAG1, nos llamó la atención que en 14 de los 16 casos en los que la pudimos realizar esta fue positiva, tanto en los núcleos del componente estromal como en los núcleos del componente celular (epitelio/mioepitelio) no inmersos en el estroma (Fig. 45).

Como resumen de las técnicas de ICQ realizadas, tanto la PAGF como el WT1 han resultado ser los marcadores de elección en la PAAF del AP, tanto en el componente fusiforme como en el epitelioide (Fig. 46). Tenemos que resaltar la negatividad de la CK19 y el prometedor camino que nos brinda la PLAG1.

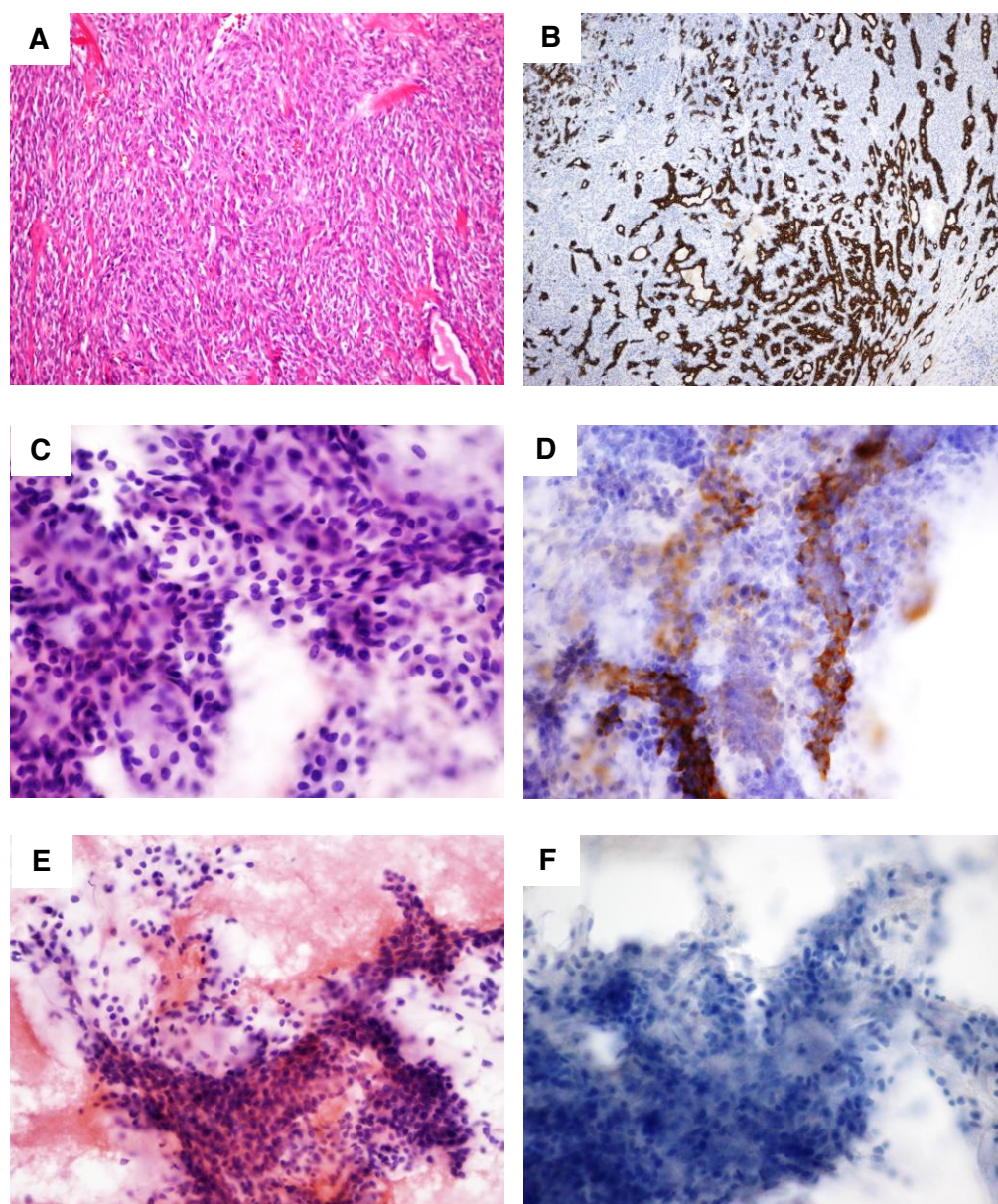


Figura 43. (A) AP celular. (B) Inmunotinción con CK19. (C) PAAF con abundante celularidad de disposición tubular. (D) CK 19 positiva. (E) PAAF con celularidad predominante sobre el estroma. (F) CK 19 negativa.

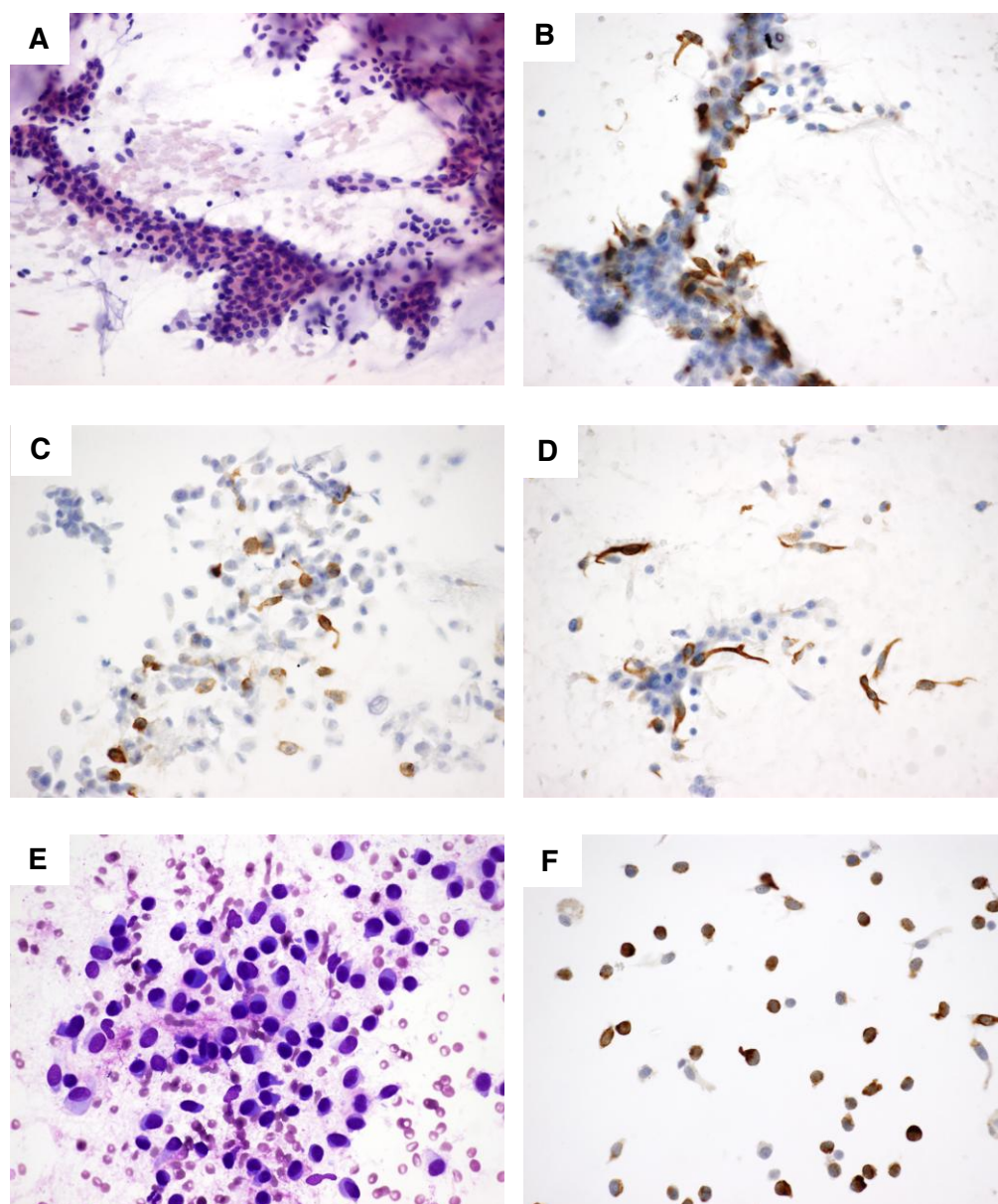


Figura 44. (A) PAAF con componente celular tubular. (B) Tinción con PAGE mostrando células positivas. (C) Moderada positividad en células sueltas con PAGE. (D) PAGE con tinción positiva en las células fusiformes. (E) Expresión de PAGE en áreas con habito plasmocitoide. (F) Intensa positividad para WT1 citoplasmático en áreas plasmocitoides.

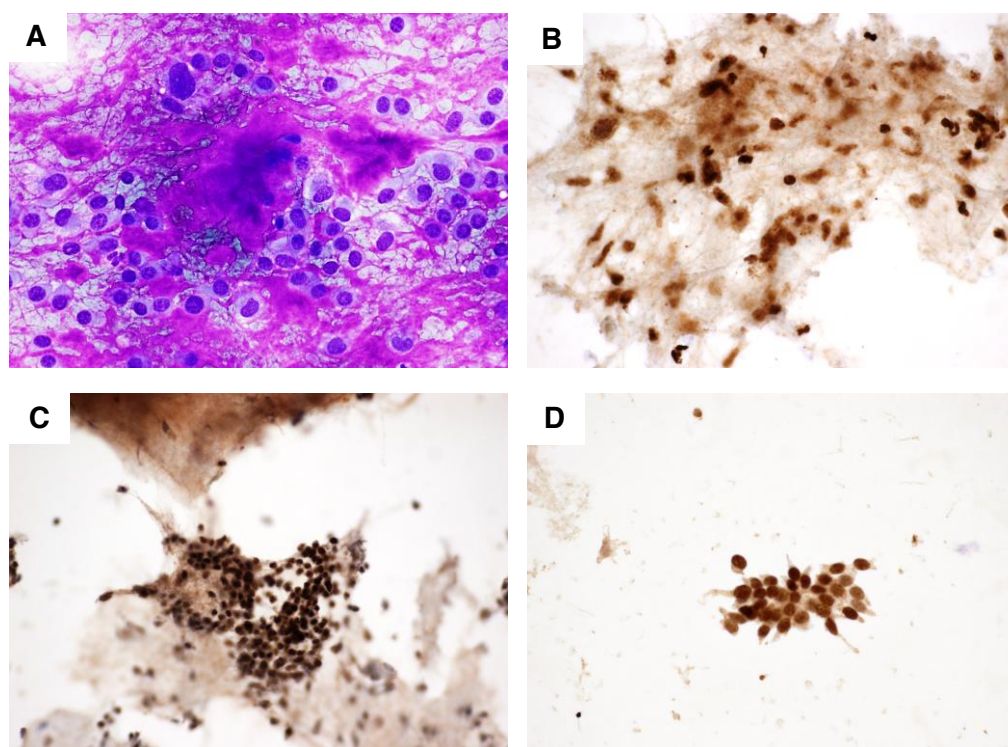


Figura 45. (A) PAAF de AP, Diff-Quik. (B) PLAG1 con positividad nuclear en células del estroma. (C) y (D) Expresión nuclear en el epitelio/mioepitelio.

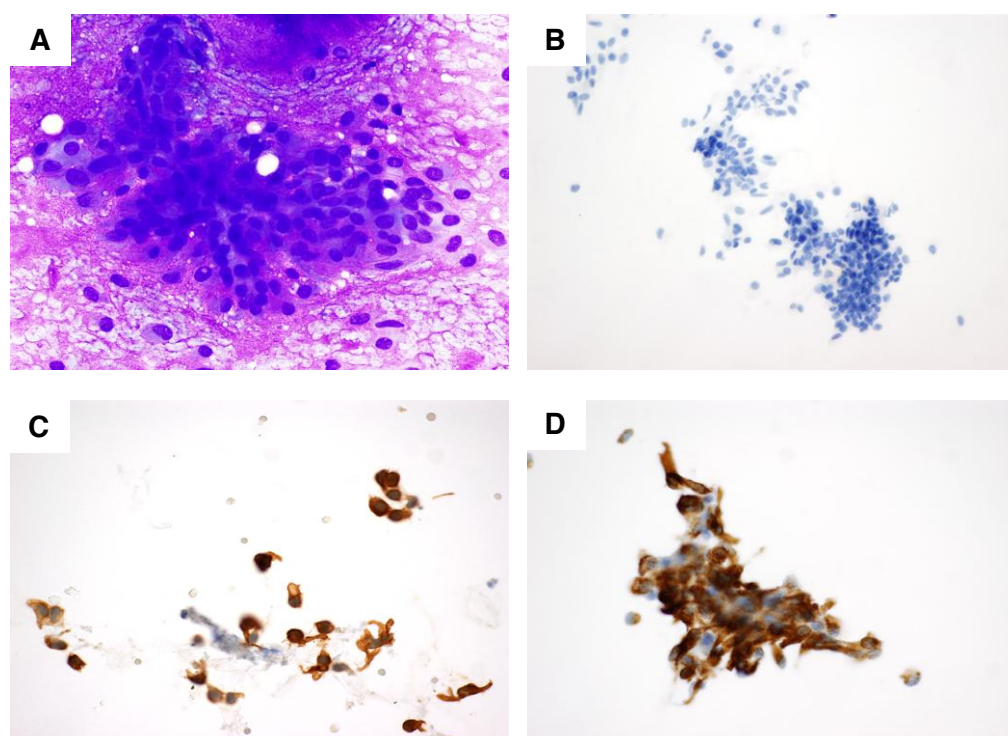


Figura 46. (A) Técnica de Diff-Quik de un AP típico con matriz condromixóide y celularidad plasmocitoide. (B) Negatividad para CK19. (C) Positividad con PAGF tanto en células plasmocitoides como fusiformes. (D) Intensa positividad para WT1.

Estudio ICQ de la PAAF en el AP

Incluimos los 40 casos diagnosticados por punción de AP y sometidos a técnicas de inmunotinción. En 19 casos se realizó CK19, en 27 casos WT1, en 22 casos PAGF y en 16 casos PLAG1.

Nº Caso	PATRÓN	CK19	PAGF	WT1	PLAG1
1	MIXTO	N H			
2	MIXTO				
3	MIXTO				
4	CM				
5	MIXTO				
6	MIXTO				
7	MIXTO				
8	CM				
9	CM				
10	MIXTO	NH	NH	1	3
11	MIXTO	NH	0	1	2
12	CM	NH	3	3	NEC
13	MIXTO	0	3	0	3
14	PC	2	NH	3	NH
15	MIXTO	0	2	3	3
16	MIXTO	0	NH	0	NH
17	MIXTO	NH	0	3	NH
18	CM	NH	3	2	NH
19	CM	NH	NH	3	NH
20	CM	NH	NH	2	3
21	MIXTO	NH	3	NH	NH
22	CM	0	2	3	3
23	MIXTO	0	3	3	NEC
24	MIXTO	0	3	NH	NH
25	CM	0	3	2	NEC
26	MIXTO	0	1	3	3
27	CM	0	1	2	3
28	MIXTO	0	0	2	3
29	CM	0	0	1	3
30	CM	0	1	3	3
31	MIXTO	NH	NH	NH	3
32	MIXTO	NH	NH	2	3
33	CM	0	3	1	0
34	CM	0	1	1	3
35	MIXTO	0	1	2	NH
36	MIXTO	0	1	2	NH
37	MIXTO	1	NH	3	NEC
38	MIXTO	NH	1	2	NEC
39	CM	NH	2	3	3
40	MIXTO	0	NH	NH	NEC

Tabla 18. Casos de citología clasificados como de predominio celular (PC): 1; condromixioide (CM): 15; o mixtos: 24. Técnicas de inmunocitoquímica realizadas en citología: CK19, PAGF, WT1 y PLAG1. NH: no hecho. NEC: no evaluable por tinción citoplasmática. 0=ningún célula teñida; 1=<del 10%; 2=10-50%; 3=50-100%.

Como puede verse en la Tabla 19, no existe una diferencia significativa en la inmunoexpresión de los marcadores utilizados y los distintos tipos de AP en el material de citología.

	Predominio celular				Condromixioide				Mixto			
Intensidad	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CK19 (19 casos)			1		7	1			10			
PAGF (22 casos)					1	3	2	4	3	4	1	4
WT1 (27 casos)				1		3	4	5	2	2	5	5
PLAG1 (16 casos)					1			7			1	7

Tabla 19. Inmunoexpresión de los marcadores en citología: CK19, PAGF, WT1 y PLAG1 en relación a los distintos tipos de AP.

En la Tabla 20 mostramos un resumen de la valoración de los distintos marcadores epiteliales y mioepiteliales en PAAF de AP. Destaca la práctica ausencia de inmunotinción con CK19. En contraposición, los marcadores mioepiteliales WT1 y PAGF muestran un alto porcentaje de casos con tinciones intensas. Con el PLAG1 también se expresa una inmunotinción fuerte en casi el 50% de los casos.

Total 31	CK19 (19 casos)	PAGF (22 casos)	WT1 (27 casos)	PLAG1 (16 casos)
0	17 (89,47%)	4 (18,18%)	2 (7,40%)	1 (6,25%)
1	1 (5,26%)	7 (31,81%)	5 (18,51%)	0
2	1 (5,26%)	3 (13,6%)	9 (33,33%)	1 (6,25%)
3	0	8 (36,36%)	11 (40,74%)	14 (87,5%)
NH/NEC	12/0 (38,70%)	9/0 (29,03%)	4/0 (12,90%)	8/7 (48,38%)

Tabla 20. Resultados de la inmunotinción (CK19, PAGF, WT1 y PLAG1) en citología. NH: no hecho. NEC: no evaluable por tinción citoplasmática.

V DISCUSIÓN

Esta tesis recoge la experiencia de 35 años del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz en el diagnóstico citológico del AP. Se trata de una de las más amplias series de correlación cito-histológica recogida en la literatura médica internacional, que ha permitido obtener importantes conclusiones acerca de la gran utilidad de la PAAF en el manejo del AP, así como de otras lesiones y neoplasias de la glándula salival.

Debido a las ventajas obvias de un diagnóstico preoperatorio en las lesiones de glándula salival, muchos centros hospitalarios utilizan la técnica de PAAF (39,88–91). La precisión o exactitud de esta técnica en el diagnóstico de los tumores de glándula salival ha sido ampliamente reconocida (34,45,92–94). Sin embargo aún existen discrepancias sobre la utilidad clínica de este procedimiento (43,44). En la mayoría de los casos se puede hacer un diagnóstico de AP mediante PAAF debido a su patrón citológico característico. La fiabilidad de la PAAF en el diagnóstico de AP varía de un 89,5 a un 96,2%. Sin embargo, puede haber problemas diagnósticos graves, y casos en donde no sea posible establecer un diagnóstico definitivo. Layfield y cols (95) encontraron problemas diagnósticos en la PAAF de glándula salival, especialmente en AP, carcinomas mucoepidermoides, sialoadenitis crónicas y linfomas. Para intentar minimizar los problemas de diagnóstico del AP se ha utilizado la tinción de PAGF como marcador específico del AP (23).

En algunas ocasiones pueden observarse mínimas variaciones en el cuadro citológico clásico del AP como son: metaplasia ductal (mucinosa, escamosa, oxífila y sebácea), celularidad estromal variable, depósitos de cristales (tirosina) e inclusiones intranucleares. Estos cambios se observan en casos en donde por otra parte vemos un cuadro citológico característico de AP. Por lo tanto, el diagnóstico de AP no se encuentra comprometido (96–98). Por otra parte, existen casos en los que hay una mayor variación morfológica en el cuadro citológico del AP. En nuestra revisión hemos prestado especial atención a los casos de AP con una presentación citológica poco frecuente o los casos erróneamente diagnosticados que podrían resultar en un tratamiento diferente del tumor. Después de analizar nuestros errores diagnósticos y aquellos casos de diagnóstico difícil, hemos dividido las presentaciones del AP en

cuatro grupos. (1) AP con un cuadro citológico típico y sin problemas diagnósticos, el 67%; (2) AP con atipia celular, el 20%; (3) AP con cambios quísticos, el 7% y (4) AP con patrón cilindromatoso, el 5%. (58)

(1) AP CON UN CUADRO CITOLÓGICO TÍPICO Y SIN PROBLEMAS DIAGNÓSTICOS

Hasta en un 67% de nuestros casos la presentación del AP correspondió al cuadro citológico típico, que consiste en la mezcla de un componente celular y estromal. La combinación de un componente epitelial/mioepitelial, citológicamente benigno, y fragmentos de estroma condromixoide con células fusiformes inmersas en él nos darán el diagnóstico (Fig. 47 A y B). La técnica del Diff-Quik es mucho más reveladora que la técnica de Papanicolaou con respecto a la imagen característica que nos proporciona del componente estromal. Así, con la primera se identifica un estroma fibrilar metacromático de color magenta, y con la segunda, este adopta un color grisáceo poco relevante. Sin embargo, podremos identificar mejor los detalles nucleares con el Papanicolaou. Las células se disponen sueltas, en placas o formando grupos poco cohesivos sin una arquitectura bien definida. Adoptan una morfología plasmocitoide y en menor cuantía fusiforme. (58,99,100)

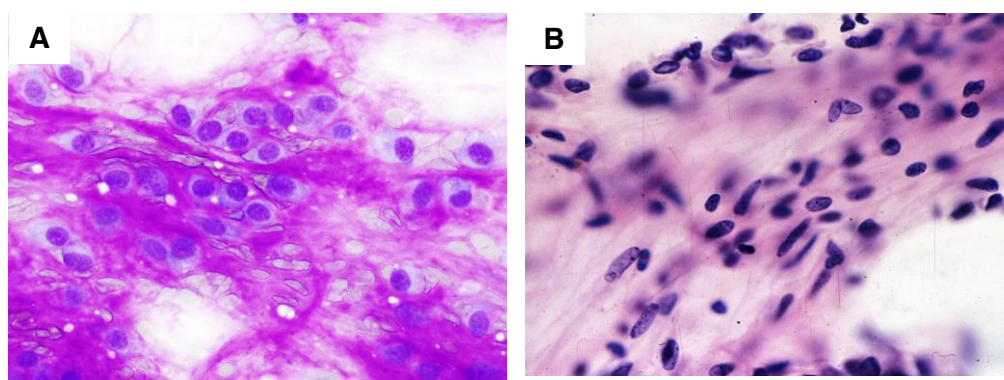


Figura 47. (A) PAAF de AP teñido con Diff-Quik con el típico estroma fibrilar metacromático y células plasmocitoides inmersas en él. (B) PAAF de AP teñido con Papanicolaou con células fusiformes.

(2) AP CON ATIPIA CELULAR

En nuestros casos, la atipia fue relativamente frecuente pero no lo suficiente como para hacernos sospechar malignidad. Eneroth y Zajizeck (32) en su estudio de 316 casos encontraron 17 con características citológicas de malignidad que resultaron ser benignos. Chan y cols (39) encontraron atipia nuclear en 15 de 31 AP (48%). En nuestra serie identificamos atipia hasta en un 20% de los casos (Fig. 48 A y B).

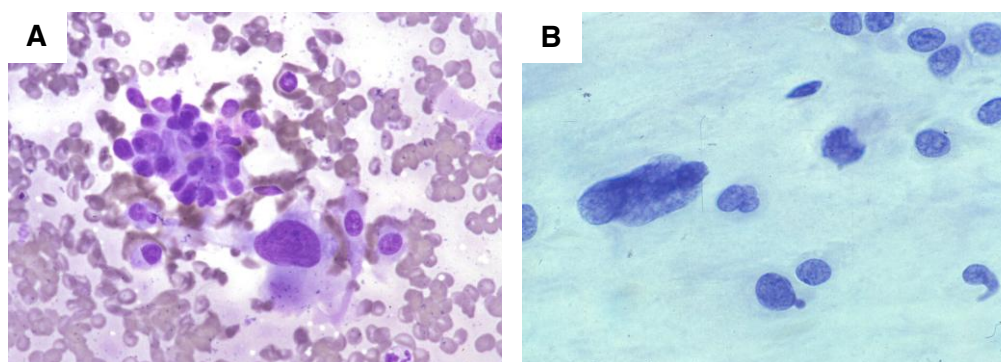


Figura 48. (A) Atipia en AP con Diff-Quik y (B) con Papanicolaou.

En nuestra experiencia, la presencia de atipia, caracterizada por la existencia de células de núcleos grandes, muchos de ellos sin citoplasma, sin otros criterios de malignidad, en un caso por otra parte típico de AP, no debe de ser considerada un criterio de malignidad sino como atipia degenerativa. Estas células atípicas son generalmente escasas y se acompañan de un gran número de células de apariencia benigna. No se identifica necrosis. Por el contrario, debe considerarse la posibilidad de malignidad cuando las células atípicas son muy abundantes y muestran un patrón cromatínico atípico. Debido a la rareza de los infartos espontáneos en el AP (101), la existencia de necrosis debe considerarse una señal de alerta en lo referente a malignidad. En uno de nuestros casos, erróneamente diagnosticado de AP maligno, el estudio anatomopatológico no mostró malignidad. En este caso vimos una alta celularidad con marcado pleomorfismo e hiperchromatismo nuclear (Fig. 49 A). El estudio anatomopatológico desveló aislados focos de células epiteliales atípicas y pleomórficas en un AP típico sin invasión (Fig. 49 B). No se debe diagnosticar malignidad cuando observemos ligera o moderada atipia celular en un frotis por otra parte típico de AP.

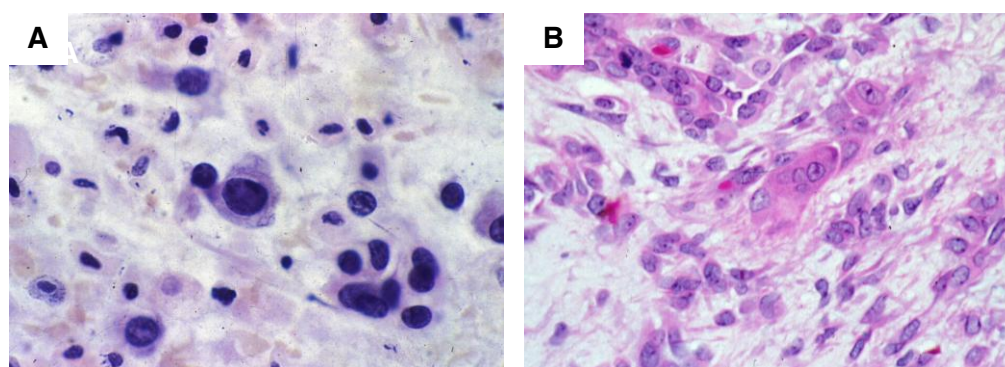


Figura 49. (A) Frotis de AP teñido con Papanicolaou con áreas focales de núcleos desnudos con pleomorfismo y atipia. (B) Estudio histológico del AP con H/E que muestra ocasionales células atípicas.

La valoración de la malignidad en la PAAF del AP es uno de los problemas más importantes referidos en la literatura (102–104) y comprobado en nuestra experiencia. En casos típicos, la transformación maligna se sospecha fácilmente, desde el punto de vista clínico, ya que el paciente refiere el crecimiento rápido de un tumor de larga evolución. En la mayoría de los casos, el diagnóstico citológico es fácil por ser evidente la malignidad.

En otras ocasiones, se identifica en la histología un AP con transformación maligna sin la existencia de signos clínicos de malignidad. Así, en cinco de nuestros casos el estudio anatomopatológico de la pieza desveló la existencia de un AP maligno, cuando el diagnóstico por PAAF había sido de AP. Después de la revisión de estos falsos diagnósticos negativos, dos de ellos mostraron moderada atipia celular y en el resto no se identificó ningún criterio de malignidad. Se han descrito errores similares en otras series de PAAF de la glándula salival (105,106). En estos casos, el componente maligno suele ser mínimamente invasivo y afectar a una parte del tumor que es por otra parte un AP benigno. Si el área maligna es pequeña puede no estar representada en la PAAF, por una limitación de muestreo. Como sugiere Hajdu y cols (107), pensamos que algunos de estos errores podrían evitarse con un muestreo más amplio del tumor, para poder identificar las áreas malignas. Habitualmente, nosotros hacemos dos punciones por paciente, pero en casos en los que clínicamente se sospeche malignidad y el procedimiento sea bien tolerado por el paciente se puede repetir la PAAF una tercera vez.

A pesar de que evitamos hacer diagnósticos descriptivos, en algunos casos con marcada atipia epitelial, nuestro diagnóstico es el de AP con atipia, quedando diferido el diagnóstico definitivo al estudio anatomopatológico.

(3) AP CON CAMBIOS QUÍSTICOS

Otro problema diagnóstico importante es el de las lesiones quísticas. Hay un gran número de lesiones quísticas en la glándula salival, que incluyen lesiones no neoplásicas o neoplásicas, tanto primarias como secundarias. En nuestra serie, 11 casos que fueron diagnosticados en citología como lesión quística benigna resultaron ser AP.

Estos casos mostraron quistes de tamaño variable con células neoplásicas revistiendo algunos de estos espacios quísticos (Fig. 50).

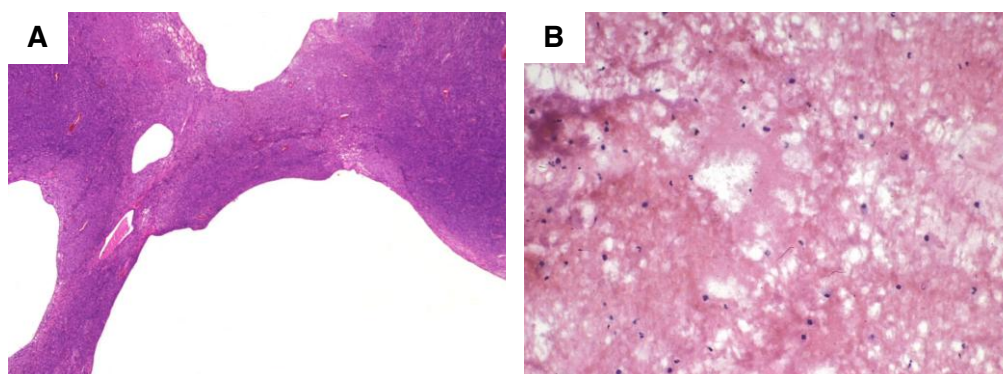


Figura 50. (A) AP con múltiples quistes. (B) PAAF con fondo hemato-quístico y ausencia de componente epitelial.

Estos cambios quísticos, la degeneración quística y la producción de moco ya se han descrito en el AP dando lugar a problemas diagnósticos, tanto en la PAAF como en la histología (108–113). En este apartado hemos disminuido el número de errores con la experiencia, debido a la incorporación de dos cambios en la rutina de la PAAF: primero, la obtención de más frotis en las lesiones quísticas, y segundo, la reaspiración del nódulo si existía palpación residual positiva. En nuestra serie, de lesiones de la glándula salival, los AP quísticos constituyen una ocasional fuente de errores diagnósticos que se produjeron durante los primeros años de la práctica de la PAAF. En la actualidad realizamos la aspiración completa de la lesión y hacemos una nueva punción si queda lesión residual, de tal manera que todo el material es procesado para

realizar un exhaustivo estudio citológico. Esta práctica ha reducido considerablemente el número de falsos diagnósticos negativos.

Otras lesiones, además del AP, en las que se pueden identificar cambios quísticos, con punciones que muestran abundante material proteináceo o mucinoso y escasa celularidad son: el carcinoma mucoepidermoide de bajo grado, el tumor de Warthin, el carcinoma de células acinares, el carcinoma epidermoide metastásico y las lesiones benignas no neoplásicas. En estos casos, el diagnóstico de AP debe sospecharse cuando sobre este fondo proteináceo o mucinoso se identifica tanto componente celular (epitelial/mioepitelial) como estromal. Si no se identifica estroma y solo se ve componente celular, pensamos que el diagnóstico debe ser el de tumor primario de glándula salival sin especificar, y abrir así otras posibilidades diagnósticas quísticas. En dos de nuestros casos, el diagnóstico citológico fue de carcinoma mucoepidermoide de bajo grado y el estudio anatomopatológico reveló que se trataba de un AP con ocasionales áreas quísticas. El carcinoma mucoepidermoide de bajo grado es uno de los tumores de glándula salival de diagnóstico más difícil (40). Para evitar este problema debemos de identificar la presencia de células escamosas intermedias y células vacuoladas antes de hacer este diagnóstico. Se han descrito casos de carcinoma mucoepidermoide sobre AP, y aún siendo poco frecuentes también debe de considerarse esta posibilidad (114).

(4) AP CON PATRÓN CILINDROMATOSO

Es bien conocido que el AP puede simular al CAQ desde un punto de vista citológico (100,115,116). En cuatro casos surgieron problemas con el diagnóstico de CAQ y AP. Tres casos fueron erróneamente diagnosticados por PAAF como AP, e histológicamente fueron CAQ. El cuarto caso fue diagnosticado citológicamente como CAQ y el diagnóstico final fue de AP. No hemos constatado una mejora entre los diagnósticos de CAQ y AP a lo largo de los tres periodos de nuestra experiencia con las PAAF de AP (58,117). Todos los casos mostraban abundantes estructuras cilindromatosas correspondientes a glóbulos metacromáticos rodeados por células tumorales (Fig. 51 A y B).

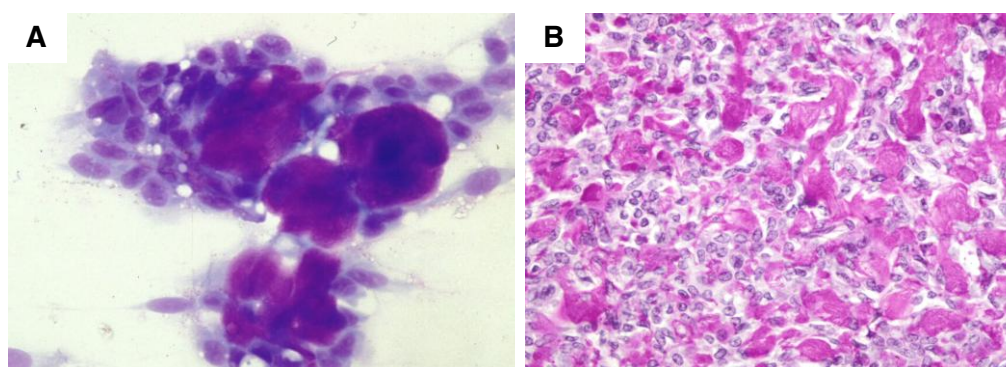


Figura 51. (A) PAAF de AP con patrón cilindromatoso. (B) AP con múltiples cilindros de estroma tapizados por células mioepiteliales.

En un 5% de nuestros casos de AP se reconoció un patrón cilindromatoso y en todos ellos se consideró la posibilidad de un CAQ. El estudio histológico de estos casos demostró ocasionales estructuras esféricas estromales rodeadas por células mioepiteliales. Desde un punto de vista citológico, no siempre es fácil diferenciar un CAQ de un AP. Las células neoplásicas son más pequeñas, hipercromáticas y con menos citoplasma en el CAQ. El estroma es más homogéneo, a diferencia del AP que es más fibrilar. Nosotros aplicamos estos criterios en el diagnóstico diferencial de estas lesiones. Sin embargo, hay casos en los que no es posible diferenciar estas dos neoplasias, y el diagnóstico de tumor de glándula salival de patrón cilindromatoso nos parece el adecuado para estos casos. Este patrón cilindromatoso también se ha descrito en el adenoma de células basales, adenocarcinoma polimorfo de bajo grado y carcinoma epi-mioepitelial (118–121). Los estudios inmunohistoquímicos no han sido todo lo prometedores que se esperaba, en lo que respecta a los marcadores p63 y c-kit, para el diagnóstico diferencial entre estos tumores (18,121,122). Recientemente, como ya hemos comentado, se ha descrito positividad en casos de CAQ con MYB y negatividad con PLAG1 en estudios ICQ (26,27). Sin embargo, sigue persistiendo en la literatura, a lo largo de los años, la PAGF como marcador del AP (14,15,23–25). Estos casos se deben comentar con el cirujano y valorarse los dos diagnósticos como posibles. También debe considerarse, aunque es mucho menos frecuente, la posibilidad de un carcinoma adenoide quístico sobre un AP. (123)

ERRORES ESPORÁDICOS

Nuestro primer estudio de la PAAF en el AP (58) demuestra una gran sensibilidad 92,6% y una alta precisión diagnóstica al igual que en otras series (32,99,124,125). En años posteriores nos hemos preguntado si nuestra experiencia y conocimiento de las diferentes presentaciones del AP resultarían en un menor número de errores diagnósticos o por lo menos en errores con una menor trascendencia en el manejo de los pacientes. Este estudio ha demostrado, como era de esperar, que la experiencia previa y el conocimiento de los posibles fallos diagnósticos aumenta la precisión diagnóstica del AP (117). También hemos observado que hay diagnósticos diferenciales problemáticos en donde es difícil mejorar. Del análisis de estos resultados hemos clasificado los errores en dos grupos. El primero muestra errores esporádicos sin patrón repetitivo que incluyen: oncocitoma, sialoadenitis, metástasis de carcinoma de células basales y neurinoma. Errores similares, y otros se han descrito en la literatura (97,126–128); representan un bajo porcentaje, aproximadamente el 11%. El segundo grupo y más importante son aquellos errores que se repiten. Están presentes en la primera, segunda y tercera serie y demuestran su dificultad en superarlos. Estos son: (1) AP maligno o atípico (2) AP con transformación quística y (3) AP de patrón cilindromatoso.

Uno de nuestros errores diagnósticos fue la metástasis de un carcinoma de células basales, interpretado en PAAF como AP. Es posible confundir este tumor con la variante rica en células epiteliales del AP, y más frecuentemente con el adenoma de células basales. La revisión del caso mostró células pequeñas con poco citoplasma y apariencia basaloide. En lugar del característico estroma fibrilar metacromático del AP se vio material amorfo mixoide, sin observarse atipia nuclear ni empalizada. Stanley M y cols (129) refieren que la reacción desmoplásica del carcinoma de células basales puede simular la matriz condromixoide del AP.

Tanto el adenoma de células basales como el mioepitelioma pueden confundirse desde un punto de vista citológico con el AP. En todos los casos en los que el AP muestra poco estroma condromixoide (AP celular) debe considerarse la posibilidad de un adenoma de células basales o de un mioepitelioma (57). En lo que respecta a esta

área diagnóstica la experiencia no incrementa la exactitud diagnóstica, como comprobamos al comparar los tres periodos. Por ello, en los casos poco claros, hemos incorporado un diagnóstico morfológico que expresa este espectro, denominando a estos casos como tumor primitivo de glándula salival de la familia del AP/adenoma de células basales/mioepitelioma. Estos tumores son tratados quirúrgicamente de manera semejante por lo que las consecuencias en el manejo del paciente son mínimas. Algunos autores consideran al AP, al adenoma de células basales y al mioepitelioma como formas diferentes de una misma familia tumoral, en donde la relativa cantidad de componente epitelial, mioepitelial o estromal va a determinar el pertenecer a uno de estos tres grupos (130). Sin embargo, recientemente varios autores (68,87) cuestionan la pertenencia del adenoma de células basales a la familia del AP y mioepitelioma, debido a que estos últimos muestran inmunexpresión con PLAG1, al contrario que el adenoma de células basales. Este anticuerpo podría servir en el diagnóstico diferencial de estas neoplasias.

Las similitudes entre el neurinoma y el AP han sido ya descritas (131). En uno de nuestros casos un tumor predominantemente fusocelular sin clara relación con la glándula parótida fue diagnosticado de neurinoma cuando se trataba de un AP. El conocimiento de esta eventualidad debe de hacernos evitar este error diagnóstico.

Ocasionalmente, se han descrito otros errores diagnósticos. Así, por ejemplo, las inclusiones intranucleares (Fig. 52) que observamos con relativa frecuencia en nuestros casos, han sido erróneamente interpretadas como carcinoma papilar de tiroides. (98)

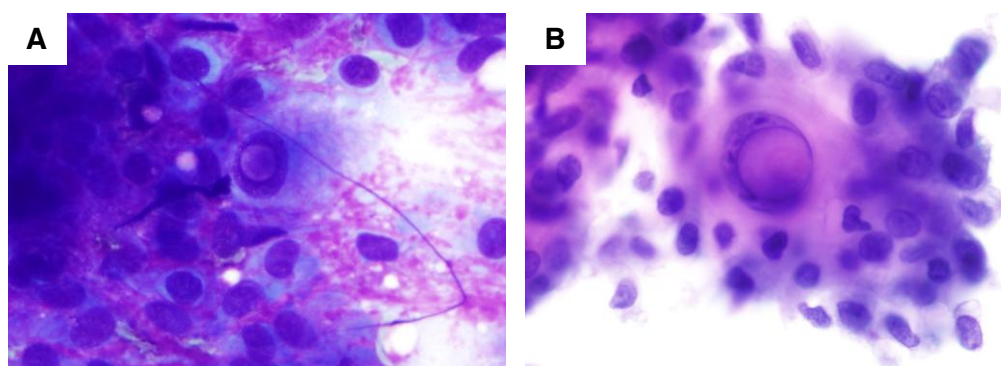


Figura 52. (A) Perforación nuclear con Diff-Quik y (B) con Papanicolaou.

Por último, se han descrito problemas en el diagnóstico histológico de los tumores de glándula salival previamente puncionados (43,46–48). Estos varían desde mínimos cambios histológicos hasta infartos completos del tumor y necrosis del mismo, haciendo el diagnóstico histológico muy difícil. En nuestros casos no se identificaron alteraciones post-punción significativas, ni casos de necrosis. Nosotros hemos visto un caso de necrosis post-punción de un tumor de Warthin (132). Pensamos que estas complicaciones aunque posibles son muy poco frecuentes y en ningún caso inhabilitan a la PAAF como método diagnóstico.

INMUNOHISTOQUÍMICA

CK19

Cavalcanti de Araujo y cols (133) y Ogawa y cols (134) demostraron expresión de CK19 en las células luminales del AP, al igual que en los conductos intercalares de la glándula salival normal. En el trabajo realizado por Margaritescu y cols (62) la tinción con CK19 fue similar a la identificada con las queratinas MNF 116 (CK 5, 6, 8, 17 y 19) con positividad en las células luminales. Según este estudio, la positividad citoplasmática en las células luminales del AP es más intensa con citoqueratinas para epitelios simples de bajo peso molecular (7, 8, 18, 19 y 20). Sin embargo, Burns y cols (61) de nueve casos estudiados con CK19 solo demostró positividad mayor del 75%, en las células luminales del AP en dos casos, negatividad en cuatro y positividad menor del 75% en tres. Nuestro estudio en biopsias de AP con CK19 reveló positividad intensa en las zonas parecidas a mioepitelio, correspondientes a zonas luminales, y negatividad en las zonas de mioepitelio modificado y mioepitelio transformado. Esta negatividad, a nivel del mioepitelio transformado, nos sirvió para identificar aéreas similares a luces de patrón cribiforme o basaloide pero con ausencia de CK19.

Con respecto al estudio de las citoqueratinas en citología, Kawahara y cols (59) realizaron EMA y CEA sobre 20 casos de improntas de AP resultando ambas positivas en 9, confirmándose de esta forma la presencia de componente epitelial luminal, y en 11 casos fueron negativas. Según estos autores puede ser difícil diferenciar morfológicamente en el AP las células luminales de las paraluminales o mioepiteliales

sin realizar técnicas de inmunocitoquímica. Como consecuencia de estos resultados, este autor considera que no es necesaria la identificación de células epiteliales lumbinales para hacer un diagnóstico de AP. Este vendría definido por las características de las células mioepiteliales. Estas a su vez las clasificó morfológicamente en cuatro tipos: (A) células sueltas de amplio citoplasma (B) células sueltas de núcleos desnudos (C) células de amplio citoplasma en grupos y (D) células de núcleos desnudos en grupos.

Nosotros realizamos la inmunotinción con CK 19 en 19 casos, de los cuales solo se detectó una ligera positividad en un caso y moderada en otro. Esta escasa expresión, si bien puede atribuirse a la variabilidad en la obtención del material por PAAF, ayuda en la interpretación de la citología, pensando que el poder de definición del AP es el componente mioepitelial y que no es posible morfológicamente hacer distinciones entre ambos tipos de células. En nuestra opinión no es posible la diferenciación entre célula epitelial y mioepitelial en la mayoría de los casos, cuando hablamos de células morfológicamente no epitelioideas o fusiformes.

Calponina

Savera y cols (63) concluyeron que la calponina es el marcador más sensible de la célula mioepitelial y que demuestra que la célula mioepitelial juega un papel relevante en la histogénesis del AP. Se expresó hasta en un 98% de los casos de AP en las zonas parecidas a mioepitelio, en un 60% de los casos en las zonas de mioepitelio modificado y en un 30% de los casos de mioepitelio transformado.

Margaritescu y cols (62) piensan que la calponina es el marcador más específico del mioepitelio. Sin embargo más recientemente se ha visto que la calponina se expresa en queratinocitos y fibras nerviosas. (134)

Ogawa y cols (135) demostraron CK 8, 18 y 19 en las células lumbinales del AP. Plantean que las células plasmocitoides derivan de las células lumbinales y no de las mioepiteliales, ya que expresan intensamente vimentina, son negativas con la actina de musculo liso y versátiles con la calponina CK18, 19 y 14. También demostró positividad de las queratinas 8, 18, y 19 en las células paralumbinales (siendo estas

queratinas específicas de la diferenciación luminal). Este hecho obliga, desde el punto de vista de los autores, a una reevaluación de la teoría de que las células paraluminales son células mioepiteliales modificadas.

En el estudio de Langman y cols (17) la calponina resultó positiva en 30 de los 31 casos de AP. Sin embargo la tinción fue parchada en 10 casos con un porcentaje menor del 10% de las células mioepiteliales teñidas. También identificaron inmunotinción con calponina en las células mixoides del mioepitelio modificado, pero no en las zonas condroides ni plasmocitoides. Tampoco identificaron immunoexpresión en el mioepitelio transformado.

Nosotros hemos realizado inmunotinción para calponina en un total de 40 casos de AP. Solo en un 11,53% de los casos las células parecidas a mioepitelio expresaban una intensidad entre el 50 y el 100%. Lo que si llama la atención es la intensa positividad en el mioepitelio de morfología fusiforme. Solo en el 3,8% de los casos el mioepitelio modificado expresó positividad con la calponina, entre el 50 y 100% de las células. En lo que respecta a la realización de calponina en la PAAF elegimos 7 casos al azar para realizar la inmunotinción y ninguno fue positivo.

P63

Genelhu y cols (122) evaluaron la p63 en un total de 10 casos de AP y otros 10 de carcinomas sobre AP. De los 10 casos de AP, en 4 la positividad fue leve y en los otros 6 fue de moderada a intensa. De los 10 casos malignos solo el 50% mostró positividad con la p63 demostrando, según los autores, que la pérdida de p63, es decir de diferenciación mioepitelial, es importante en la evolución del carcinoma sobre AP y corrobora a la p63 como un buen marcador mioepitelial de los tumores de la glándula salival. Zhu y cols (136) demostraron la diferencia entre el AP y el carcinoma sobre AP, con marcadores de proliferación celular (Ki67, ciclina E y p63). La p63 fue identificada en el núcleo de las células paraluminales, tanto en la glándula salival normal como neoplásica. La expresión de la p63 disminuyó notablemente en los casos malignos. Sugieren que un Ki67 < del 5% puede ser seleccionado como punto de corte para demostrar una baja proliferación. Langman y cols (17) demostraron que más de la

mitad de las células mioepiteliales eran puestas de manifiesto en el 68% de los AP, con la p63. De los diferentes tipos de células mioepiteliales, las parecidas a mioepitelio se expresaron de forma más uniforme. En lo que respecta al mioepitelio modificado, la mayor parte fue puesto de manifiesto con la p63, pero en la mayoría de los casos menos del 50% de las células fueron positivas. En lo que respecta al mioepitelio transformado el único caso con diferenciación cribiforme fue negativo con la p63 y fueron positivos los nidos escamosos.

En nuestro estudio, de 40 casos de AP con inmunotinción para la p63, el 53,8% de los casos con zonas parecidas a mioepitelio fueron positivas para la p63. Solo el 7,89% de las zonas de mioepitelio modificado fueron positivas con la p63. En lo que respecta al mioepitelio transformado el porcentaje mayor de inmunotinción corresponde al patrón cribiforme con un 55,5% de los casos, siendo negativa en las zonas escamoides.

PAGF

Nishimura y cols (25) estudiaron 60 casos de biopsias de AP, 5 de adenomas de células basales y 10 CAQ. Solo identificaron positividad para la PAGF en el AP, según comentan los autores, por su habilidad para mostrar diferenciación mixocondromatosa. También Curran y cols (14) realizaron un estudio inmunohistoquímico sobre biopsias en 27 adenomas canaliculares, 21 AP, y 30 adenocarcinomas polimorfos de bajo grado. La expresión fue difusamente positiva en los casos de AP, lineal en proximidad con el tejido conectivo en los adenomas canaliculares y negativo en los adenocarcinomas polimorfos de bajo grado.

En lo que respecta a la citología, Domagala y cols (23), sobre 12 casos de AP obtenidos por punción y por improntas, estudiaron la PAGF, la vimentina y queratinas de amplio espectro. Los resultados se valoraron con técnicas de inmunofluorescencia. En 11 casos resultaron positivos los tres anticuerpos. Tres casos de CAQ, teñidos con la PAGF, resultaron negativos. Shah y cols (15) utilizando bloque celular, recogieron un total de 10 AP, 8 casos más con citología atípica en donde no se podía excluir un CAQ y 8 CAQ. El 100% de los casos de AP fueron positivos con la PAGF y un 80%

con el CD57. Los 8 casos de CAQ fueron negativos con la PAGF. De los AP atípicos, los que resultaron ser AP fueron positivos y los que resultaron ser CAQ fueron negativos. Ostrzega y cols (24) demostraron el valor de la PAGF en el diagnóstico de 33 casos de PAAF que incluían 10 AP, 6 glándulas salivales normales, 3 sialoadenitis crónicas, 3 tumores de Warthin, 2 CAQ, 3 adenocarcinomas, 2 tumores mixtos malignos, 1 carcinoma de células acinares y 3 carcinomas mucoepidermoides. La positividad fue del 100% para los casos de AP y tumor mixto maligno. Un caso de los 3 adenocarcinomas y dos de los 3 carcinomas mucoepidermoides también resultaron positivos.

Nosotros hemos valorado la PAGF en 40 casos de AP en biopsia. El 38,4% de los casos mostraba positividad de grado 3 en las zonas parecidas a mioepitelio, el 81,5% mostró positividad de grado 3 en las zonas de mioepitelio modificado y el 55,5% en las zonas de mioepitelio transformado, concretamente en el patrón cribiforme.

Respecto a los casos de PAAF, hemos realizado la inmunotinción con PAGF en un total de 22 casos. En el 81,82% la tinción fue positiva mientras que en el 18,18 % de los casos esta fue negativa. En el 31,81% fue de grado 1(< del 10%), en el 13,6% de grado 2 (entre el 10-50%) y en el 36,36% fue de grado 3 (>del 50%).

WT1

El único trabajo en donde se ha evaluado la expresión de WT1 en el AP ha sido el de Langman y cols (17). El WT1 no tiñe las células mioepiteliales normales de la glándula salival. La tinción citoplasmática del WT1 estuvo presente en todos los casos de AP y en 29 fueron positivas más del 50% de las células mioepiteliales. El WT1 mostró una menor variabilidad de tinción, en el espectro de diferenciación mioepitelial, que la calponina y la p63; siendo esta diferencia mucho más marcada en los casos de mioepitelio transformado. Los autores concluyen que el WT1 es un marcador muy sensible del mioepitelio neoplásico en el AP.

En lo que respecta a nuestros casos, el WT1 fue el marcador mioepitelial citoplasmático más intenso y difuso en las distintas zonas de mioepitelio. El 88,46% de las zonas parecidas a mioepitelio fueron positivas con el WT1, el 97,36% del mioepitelio modificado resultó positivo y el 100% del mioepitelio transformado con patrón cribiforme.

En lo que respecta a la PAAF, estudiamos el WT1 en 27 punciones de AP, identificando en un 40,74% de las mismas una intensa positividad citoplasmática tanto en las células fusiformes como epitelioides.

PLAG1

PLAG1 es un protooncogen localizado en el cromosoma 8q12 y activado en el AP, así como en otros tumores, sobre todo los tumores benignos de partes blandas. (79,80,85)

Aström y cols (80) identificaron sobreexpresión de PLAG1 en 2 casos de carcinomas de glándula salival sobre un total de 11 tumores malignos. El primero era un carcinoma sobre AP, y en el segundo caso, correspondiente a un CAQ, los autores plantean que podría corresponder a un CAQ sobre AP. Daa y cols (137) estudiaron la sobreexpresión del PLAG1 en 34 casos de CAQ, resultando en todos ellos negativo.

Varios autores (66–68,85,86) han confirmado la utilidad de las técnicas de inmunohistoquímica con el PLAG1 en el diagnóstico del AP. Esta sobreexpresión ocurre tanto en adenomas con anormalidades en 8q12 como en tumores con cariotipo normal, de ahí la importancia de la aplicación de la técnica de IHQ en estos tumores.

Nosotros hemos realizado el estudio en un total de 16 casos de PAAF. En un 87,5% de nuestros casos se demostró positividad entre el 50 y 100% de las células.

En lo que respecta a las limitaciones de este trabajo en relación a la ICQ, destacaría la variabilidad en el número de casos en donde hemos podido realizar las distintas técnicas de ICQ. Esto es debido sobre todo a las limitaciones en la cantidad

de material de PAAF, ya que hemos utilizado la biopsia y la PAAF del mismo paciente, con material de archivo.

VI CONCLUSIONES

1. El diagnóstico por PAAF del AP de glándula salival muestra sensibilidad y especificidad muy altas y debe ser la técnica de elección en el diagnóstico preoperatorio.
2. Para que la eficacia diagnóstica sea muy alta deben tenerse en cuenta variantes morfológicas como son: quistificación, atipia nuclear degenerativa y patrón cilindromatoso, para evitar errores diagnósticos innecesarios.
3. La experiencia acumulada por el patólogo en el diagnóstico del AP conlleva una disminución en los diagnósticos falsos negativos, como es el caso de las lesiones quísticas. No obstante, esta experiencia no impide evitar un mínimo de errores, probablemente relacionados con la obligada limitación del muestreo lesional por parte de la PAAF, así como limitaciones interpretativas morfológicas.
4. Los mejores marcadores para el “mioepitelio-like” o zonas parecidas a mioepitelio son la calponina para el mioepitelio fusiforme, y WT1 y p63 para las zonas paraluminales, con expresión más intensa y extensa del WT1.
5. Los mejores marcadores para el mioepitelio modificado, sobre todo el de tipo mixoide, son WT1 y PAGF, ambos con intensa inmunoexpresión.
6. En el mioepitelio transformado cribiforme destaca la ausencia de CK19 y la intensa inmunoexpresión de WT1 y p63. El WT1 es el marcador de elección para el mioepitelio transformado epitelioide.
7. En la PAAF del AP la CK19 no es la CK de elección para diferenciar epitelio de mioepitelio.
8. En el material de PAAF para el diagnóstico de AP los marcadores mioepiteliales válidos son WT1 y PAGF. En lo que respecta al PLAG1 su inmunoexpresión nuclear, tanto en el componente celular como estromal, establece una posible utilización en el diagnóstico diferencial con otras neoplasias morfológicamente semejantes al AP.

VII RESUMEN

El AP es el tumor más frecuente de la glándula salival tanto en adultos como en niños. Representa el 75-80% de los tumores de parótida y el 60% de todos los tumores de las glándulas salivales. El diagnóstico citológico por PAAF es, en la mayoría de los casos, fácil cuando se identifica una combinación de células epiteliales/mioepiteliales inmersas en un estroma fibrilar. Sin embargo, un pequeño número de AP pueden plantear problemas diagnósticos. Así, tras el estudio de nuestra serie destacamos:

Los AP con patrón cilindromatoso plantearán problemas de diagnóstico diferencial con el CAQ.

Los AP quísticos serán una fuente de falsos diagnósticos negativos de AP.

Los AP con atipia plantearán problemas diagnósticos de malignidad.

Los AP celulares con poco estroma plantearán problemas de diagnóstico diferencial con tumores basaloides.

Es en estos casos difíciles en donde la experiencia del citopatólogo y, en último término, la ICQ puede ayudarnos a alcanzar el diagnóstico correcto.

De un total de 2.349 punciones de glándula salival entre los años 1980 y 2011 se realizó el diagnóstico de AP en 598 casos, que fue correcto en 571, es decir se realizaron 27 FP. En otros 35 casos se estableció por biopsia el diagnóstico de AP, y en la PAAF otros diagnósticos diferentes; son los FN. Durante los tres periodos que ha durado el trabajo hemos mejorado con respecto a la tasa de FN, siendo los AP quísticos los que han mostrado una disminución más notable. Así mismo, hemos aprendido a valorar la atipia en los AP y darle su justo valor, sin plantear problemas de diagnóstico diferencial con malignidad. No ocurre así con los casos de patrón cilindromatoso que, si bien son pocos, nos han inducido a emitir en ciertos casos un diagnóstico morfológico sugiriendo la posibilidad de que se trate de un CAQ. Los casos de AP de predominio celular también nos han llevado a emitir diagnósticos morfológicos, como el de tumor primario de glándula salival de la familia de AP/adenoma de células basales/mioepitelioma.

Este planteamiento nos llevó a realizar distintas técnicas tanto de IHQ como de ICQ para valorar si estas nos podrían ayudar en el diagnóstico del AP. Estudiamos 40 casos de biopsias de AP con marcadores epiteliales (CK19) y mioepiteliales (WT1, PAGF, p63 y calponina) y los mismos 40 casos con PAAF, aunque con un número desigual de casos por marcador, con marcadores epiteliales (CK19) y mioepiteliales (WT1, PAGF y PLAG1). En cuanto a las biopsias, el mejor marcador de los diferentes tipos de mioepitelio: “mioepitelio-like” mioepitelio modificado y mioepitelio transformado fue WT1, destacando la calponina como marcador de elección en el componente fusiforme de las zonas “mioepitelio-like” y p63 en las áreas cribiformes o basaloides del mioepitelio transformado. La PAGF también demostró una positividad intensa en el mioepitelio modificado, sobre todo en el de tipo mixoide.

En lo que se refiere a la PAAF, destacó la ausencia de inmunotinción en la mayoría de los casos con CK19. El marcador de elección para el mioepitelio fue así mismo WT1, siendo la PAGF muy positiva e intensa tanto en el componente epitelioide como fusiforme. Queremos resaltar la inmunotinción nuclear de PLAG1, tanto en el componente celular como estromal, siendo esta técnica de ICQ muy prometedora para apoyar el diagnóstico de AP frente al CAQ y el adenoma de células basales.

VIII SUMMARY

Pleomorphic adenoma (PA) is the most common salivary gland neoplasm, both in adults and in children. It represents 60% of all salivary gland tumors and 75-80% of those of the parotid gland. Its cytologic diagnosis using fine needle aspiration (FNA) is easy in most cases. The combination of metachromatic fibrillary stroma, epithelial and myoepithelial cells results in a characteristic cytologic image. Nevertheless, in a small number of cases diagnostic difficulties are present. This study concludes that the following morphologic variants are the most common source of diagnostic errors:

PA with a cylindromatous pattern. In these cases diagnostic problems with adenoid cystic carcinoma may arise.

Cystic PA, that can result in a false negative diagnosis.

PA with atypia, that may result in an image suspicious of malignancy.

Cellular PA, with scarce stroma. These cases may resemble basaloid neoplasms.

These morphologic patterns represent the difficult diagnostic cases in which for a precise diagnosis, the pathologists experience and immunocytochemistry result helpful.

A total of 598 cases diagnosed cytologically as PA were selected among 2349 FNA of salivary gland tumors performed during the period between 1980 and 2011. In 571 of those 598 cases, the diagnosis was correct, with 27 false positive diagnoses (FP) of PA. We also selected 35 cases of histologically proven cases of PA with a different cytologic diagnosis. These are the false negative (FN) diagnoses of PA. During the three periods of time analyzed we have observed a reduction in the number of FN (FN) diagnoses mostly due to an increase in the recognition of cystic cases of PA. Similarly, problems related to atypia in PA were also reduced, avoiding the unnecessary differential diagnosis with malignancy. Diagnostic problems related to the cylindromatous pattern remain a problem since in a few cases differentiation from adenoid cystic carcinoma was not possible. Some cases of cellular PA were indistinguishable from basal cell adenoma and myoepithelioma. In these cases a morphologic diagnosis considering these three possibilities was given.

These limitations led us to consider if immunocytochemistry could be a helpful diagnostic tool for a more precise diagnosis of PA. We evaluated 40 histologic cases of PA with epithelial markers (CK19) and myoepithelial ones (WT1, PAGF, p63 and calponin). FNA cytologic samples from the same 40 cases of PA were also evaluated using immunocytochemistry for epithelial (CK19) and myoepithelial markers (WT1, PAGF and PLAG1). Concerning histologic samples, the best marker for the different types of myoepithelial cells (“myoepithelial-like” modified myoepithelium and transformed myoepithelium) was WT1. Calponin was very useful for the spindle component of the “myoepithelial-like” areas and p63 for the cribriform and basaloid areas of transformed myoepithelium. PAGF also showed intense expression in modified myoepithelium, mostly myxoid type.

FNA cytologic samples showed, in most cases, no expression of CK19. The best myoepithelial marker was also WT1, and PAGF showed an intense expression in both the epithelioid and spindle cell components. We would like to highlight the nuclear immunoexpression of PLAG1 that results in a promising molecule for the differentiation of PA from adenoid cystic carcinoma and basal cell adenoma.

IX REFERENCIAS

1. Cheuk W, Chan JKC. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology*. 2007 Jul;51(1):1–20.
2. Eveson J, Auclair P, Gnepp D, El-Naggar A. Tumours of the salivary glands. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumours*. Lyon, France: IARC; 2005. p. 209–15.
3. Rosai J. Major and minor salivary glands. En: Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology* 10th e Vol I: Mosby Elsevier; 2011. p. 817–55.
4. Ettl T, Schwarz-Furlan S, Gosau M, Reichert TE. Salivary gland carcinomas. *Oral Maxillofac Surg*. 2012 Sep;16(3):267–83.
5. Eversole LR. Histogenic classification of salivary tumors. *Arch Pathol*. 1971 Dec;92(6):433–43.
6. Regezi J, Batzakis J. Histogenesis of salivary gland. *Otolaryngol Clin North Am*. 1977 Jun;10(2):297–307.
7. Burford-Mason A, Dardick I, van Nostrand P. Salivary gland neoplasms--stem cell histogenesis? *J Laryngol Otol*. 1990 Jun;104(6):521–3.
8. Dardick I. Mounting evidence against current histogenetic concepts for salivary gland tumorigenesis. *Eur J Morphol*. 1998;36(Supplement):257–61.
9. Dardick I, Byard RW, Carnegie JA. A review of the proliferative capacity of major salivary glands and the relationship to current concepts of neoplasia in salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990 Jan;69(1):53–67.
10. Dardick I, Burford-Mason A. Current status of histogenetic and morphogenetic concepts of salivary gland tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol*. 1993;4(5):639–77.
11. Martinez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol*. 1989 Oct;13(10):879–99.
12. Ohtomo R, Mori T, Shibata S, Tsuta K, Maeshima AM, Akazawa C, et al. SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. *Mod Pathol*. Nature Publishing Group; 2013 Aug;26(8):1041–50.
13. Nagao T, Sato E, Inoue R, Oshiro H, H Takahashi R, Nagai T, et al. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. *Acta Histochem Cytochem*. 2012 Oct 31;45(5):269–82.

14. Curran AE, Allen CM, Beck FM, Damm DD, Murrah VA. Distinctive pattern of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity useful in distinguishing fragmented pleomorphic adenoma, canalicular adenoma and polymorphous low grade adenocarcinoma of minor salivary glands. *Head Neck Pathol.* 2007 Sep;1(1):27–32.
15. Shah SS, Chandan VS, Wilbur DC, Khurana KK. Glial fibrillary acidic protein and CD57 immunolocalization in cell block preparations is a useful adjunct in the diagnosis of pleomorphic adenoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2007 Sep;131(9):1373–7.
16. Zhu S, Schuerch C, Hunt J. Review and updates of immunohistochemistry in selected salivary gland and head and neck tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2015 Jan;139(1):55–66.
17. Langman G, Andrews CL, Weissferdt A. WT1 expression in salivary gland pleomorphic adenomas: a reliable marker of the neoplastic myoepithelium. *Mod Pathol.* 2011 Feb;24(2):168–74.
18. Mino M, Pilch BZ, Faquin WC. Expression of KIT (CD117) in neoplasms of the head and neck: an ancillary marker for adenoid cystic carcinoma. *Mod Pathol.* 2003 Dec;16(12):1224–31.
19. Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. C-kit expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and monomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 May;95(5):586–93.
20. Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Vahlberg T, Grénman R. Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumor markers in salivary gland malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. *Acta Oncol.* 2006 Jan;45(6):669–75.
21. Woo VL, Bhuiya T, Kelsch R. Assessment of CD43 expression in adenoid cystic carcinomas, polymorphous low-grade adenocarcinomas, and monomorphic adenomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Oct;102(4):495–500.
22. Seethala RR, Pasha TL, Raghunath PN, Livolsi V a, Zhang PJ. The selective expression of CD43 in adenoid cystic carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008 Mar;16(2):165–72.
23. Domagala W, Halczy-Kowalik L, Weber K, Osborn M. Coexpression of glial fibrillary acid protein, keratin and vimentin. A unique feature useful in the diagnosis of pleomorphic adenoma of the salivary gland in fine needle aspiration biopsy smears. *Acta Cytol.* 1988;32(3):403–8.

24. Ostrzega N, Cheng L, Layfield L. Glial fibrillary acid protein immunoreactivity in fine-needle aspiration of salivary gland lesions: a useful adjunct for the differential diagnosis of salivary gland neoplasms. *Diagn Cytopathol.* 1989 Jan;5(2):145–9.
25. Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E, Miwa A. Differential diagnosis of pleomorphic adenoma by immunohistochemical means. *J Laryngol Otol.* 1991 Dec;105(12):1057–60.
26. Foo W-C, Jo V, Krane JF. Utility of Myb, CD117 and PLAG1 Immunocytochemistry in Fine Needle Aspiration Diagnosis of Salivary Gland Neoplasms. *J Am Soc Cytopathol.* Elsevier Inc.; 2013;2(1):S51–2.
27. Pusztaszeri MP, Sadow PM, Ushiku A, Bordinon P, McKee TA, Faquin WC. MYB immunostaining is a useful ancillary test for distinguishing adenoid cystic carcinoma from pleomorphic adenoma in fine-needle aspiration biopsy specimens. *Cancer Cytopathol.* 2014 Apr;122(4):257–65.
28. American Joint Committee on Cancer. *AJCC. Cancer Staging Manual.* 7th ed. New York: Springer; 2009.
29. Ansari NA, Derias NW. Fine needle aspiration cytology. *J Clin Pathol.* 1997 Jul;50(7):541–3.
30. Stewart FW. The Diagnosis of Tumors by Aspiration. *Am J Pathol.* 1933 Jan;9(Suppl):801–12.3.
31. Zajicek J. *Aspiration biopsy cytology: cytology of supradiaphragmatic organs.* Karger S. New York; 1974.
32. Eneroth C, Zajicek J. Aspiration biopsy of salivary gland tumors. III. Morphologic studies on smears and histologic sections from 368 mixed tumors. *Acta Cytol.* 1966;10(6):440–54.
33. Cramer H, Layfield L, Lampe H. Fine-needle aspiration of salivary glands: its utility and tissue effects. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1993 Jun;102(6):483–5.
34. Frable MA, Frable WJ. Fine-needle aspiration biopsy of salivary glands. *Laryngoscope.* 1991 Mar;101(3):245–9.
35. Heller KS, Dubner S, Chess Q, Attie JN. Value of fine needle aspiration biopsy of salivary gland masses in clinical decision-making. *Am J Surg.* 1992 Dec;164(6):667–70.
36. Roland NJ, Caslin AW, Smith PA, Turnbull LS, Panarese A, Jones AS. Fine needle aspiration cytology of salivary gland lesions reported immediately in a head and neck clinic. *J Laryngol Otol.* 1993 Nov;107(11):1025–8.

37. Yousem DM. Dashed hopes for MR imaging of the head and neck: the power of the needle. *Radiology*. 1992 Jul;184(1):25–6.
38. Díaz KP, Gerhard R, Domingues RB, Martins LL, Prado Ribeiro AC, Lopes MA, et al. High diagnostic accuracy and reproducibility of fine-needle aspiration cytology for diagnosing salivary gland tumors: cytohistologic correlation in 182 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Aug;118(2):226–35.
39. Chan MK, McGuire LJ, King W, Li AK, Lee JC. Cytodiagnosis of 112 salivary gland lesions. Correlation with histologic and frozen section diagnosis. *Acta Cytol*. 1992;36(3):353–63.
40. Layfield LJ, Glasgow BJ. Diagnosis of salivary gland tumors by fine-needle aspiration cytology: a review of clinical utility and pitfalls. *Diagn Cytopathol*. 1991 Jan;7(3):267–72.
41. Mehle ME, Kraus DH, Wood BG, Benninger MS, Eliachar I, Levine HL, et al. Facial nerve morbidity following parotid surgery for benign disease: the Cleveland Clinic Foundation experience. *Laryngoscope*. 1993 Apr;103(4 Pt 1):386–8.
42. Owen ER, Banerjee AK, Prichard AJ, Hudson EA, Kark AE. Role of fine needle aspiration cytology and computed tomography in the diagnosis of parotid swellings. *Br J Surg*. 1989 Dec;76(12):1273–4.
43. Batsakis JG, Sneige N, el-Naggar AK. Fine-needle aspiration of salivary glands: its utility and tissue effects. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1992 Feb;101(2 Pt 1):185–8.
44. McGurk M, Hussain K. Role of fine needle aspiration cytology in the management of the discrete parotid lump. *Ann R Coll Surg Engl*. 1997 May;79(3):198–202.
45. Qizilbash AH, Sianos J, Young JE, Archibald SD. Fine needle aspiration biopsy cytology of major salivary glands. *Acta Cytol*. 1985;29(4):503–12.
46. Gottschalk-Sabag S, Glick T. Necrosis of parotid pleomorphic adenoma following fine needle aspiration. A case report. *Acta Cytol*. 1995;39(2):252–4.
47. Li S, Baloch ZW, Tomaszewski JE, Livolsi VA. Worrisome histologic alterations following fine-needle aspiration of benign parotid lesions. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jan;124(1):87–91.
48. Mukunyadzi P, Bardales RH, Palmer HE, Stanley MW. Tissue effects of salivary gland fine-needle aspiration. Does this procedure preclude accurate histologic diagnosis? *Am J Clin Pathol*. 2000 Nov;114(5):741–5.

49. Engzell U, Esposti PL, Rubio C, Sigurdson A, Zajicek J. Investigation on tumour spread in connection with aspiration biopsy. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1971 Aug;10(4):385–98.
50. Schmidt RL, Hall BJ, Wilson AR, Layfield LJ. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of fine-needle aspiration cytology for parotid gland lesions. *Am J Clin Pathol.* 2011 Jul;136(1):45–59.
51. Schmidt RL, Hall BJ, Layfield LJ. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of ultrasound-guided core needle biopsy for salivary gland lesions. *Am J Clin Pathol.* 2011 Oct;136(4):516–26.
52. Douville N, Bradford C. Comparison of ultrasound-guided core biopsy versus fine-needle aspiration biopsy in the evaluation of salivary gland lesions. *Head Neck.* 2013;35(11):1657–61.
53. Huang Y-C, Wu C-T, Lin G, Chuang W-Y, Yeow K-M, Wan Y-L. Comparison of ultrasonographically guided fine-needle aspiration and core needle biopsy in the diagnosis of parotid masses. *J Clin Ultrasound.* 2012 May;40(4):189–94.
54. Eveson JW, Cawson RA. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol.* 1985 May;146(1):51–8.
55. Zbären P, Stauffer E. Pleomorphic adenoma of the parotid gland: histopathologic analysis of the capsular characteristics of 218 tumors. *Head Neck.* 2007 Aug;29(8):751–7.
56. Foote F, Frazell E. Tumors of the major salivary glands. *Cancer.* 1953;(November):1065–133.
57. Elsheikh T, Bernacki E. Fine Needle Aspiration Cytology of Cellular Pleomorphic Adenoma. *Acta Cytol.* 1996;40(6):1165–75.
58. Viguer J, Vicandi B, Jimenez-Heffernan J, López-Ferrer P, Linares M. Fine Needle Aspiration Cytology of Pleomorphic adenoma. An analysis of 212 cases. *Acta Cytol.* 1997;41(3):786–94.
59. Kawahara A, Harada H, Kage M, Yokoyama T, Kojiro M. Characterization of the epithelial components in pleomorphic adenoma of the salivary gland. *Acta Cytol.* 2002;46(6):1095–100.
60. Krane JF, Faquin WC. Salivary Gland. In: Cibas ES, Ducatman BS, editors. *Cytology Diagnostic Principles and Clinical Correlates.* Philadelphia; 2014. p. 299–332.

61. Burns BF, Dardick I, Parks WR. Intermediate filament expression in normal parotid glands and pleomorphic adenomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1988 Jan;413(2):103–12.
62. Margaritescu C, Florescu M, Raica M, Simionescu C, Mogoanta L, Preda E. The immunohistochemical profile of luminal epithelial neoplastic component from pleomorphic adenomas of salivary glands. *Rom J Morphol Embryol*. 2004;45:97–118.
63. Savera A, Gown A, Zarbo RJ. Immunolocalization of three novel smooth muscle-specific proteins in salivary gland pleomorphic adenoma: assessment of the morphogenetic role of myoepithelium. *Mod Pathol*. 1997 Nov;10(11):1093–100.
64. Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Essa A, Abé T, Babkair HA, et al. Podoplanin is a novel myoepithelial cell marker in pleomorphic adenoma and other salivary gland tumors with myoepithelial differentiation. *Virchows Arch*. 2013 Mar;462(3):297–305.
65. Maruya S-I, Kies MS, Williams M, Myers JN, Weber RS, Batsakis JG, et al. Differential expression of p63 isotypes (DeltaN and TA) in salivary gland neoplasms: biological and diagnostic implications. *Hum Pathol*. 2005 Jul;36(7):821–7.
66. Matsuyama A, Hisaoka M, Nagao Y, Hashimoto H. Aberrant PLAG1 expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland: a molecular genetic and immunohistochemical study. *Virchows Arch*. 2011 May;458(5):583–92.
67. Bahrami A, Dalton JD, Shivakumar B, Krane JF. PLAG1 alteration in carcinoma ex pleomorphic adenoma: immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies of 22 cases. *Head Neck Pathol*. 2012 Sep;6(3):328–35.
68. Rotellini M, Palomba A, Baroni G, Franchi A. Diagnostic Utility of PLAG1 Immunohistochemical Determination in Salivary Gland Tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Aug 16;22(00):390–4.
69. Martins C, Fonseca I, Roque L, Pereira T, Ribeiro C, Bullerdiek J, et al. PLAG1 gene alterations in salivary gland pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a combined study using chromosome banding, in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mod Pathol*. 2005 Aug;18(8):1048–55.
70. Zbären P, Vander Poorten V, Witt RL, Woolgar J a, Shaha AR, Triantafyllou A, et al. Pleomorphic adenoma of the parotid: formal parotidectomy or limited surgery? *Am J Surg*. 2013 Jan;205(1):109–18.

71. O'Brien CJ. Current management of benign parotid tumors--the role of limited superficial parotidectomy. *Head Neck*. 2003 Nov;25(11):946–52.
72. Quer M, Pujol A, León X, López M, García J, Orús C, et al. Parotidectomies in benign parotid tumours: “Sant Pau” surgical extension classification. *Acta otorrinolaringológica española*. 2010;61(1):1–5.
73. Koch M, Zenk J, Iro H. Long-term results of morbidity after parotid gland surgery in benign disease. *Laryngoscope*. 2010 Apr;120(4):724–30.
74. Albergotti W, Nguyen S, Zenk J, Gillespie M. Extracapsular dissection for benign parotid tumors: a meta-analysis. *Laryngoscope*. 2012 Sep;122(9):1954–60.
75. Witt RL, Rejto L. Pleomorphic adenoma: extracapsular dissection versus partial superficial parotidectomy with facial nerve dissection. *Del Med J*. 2009 Mar;81(3):119–25.
76. Klintworth N, Zenk J, Koch M, Iro H. Postoperative complications after extracapsular dissection of benign parotid lesions with particular reference to facial nerve function. *Laryngoscope*. 2010 Mar;120(3):484–90.
77. Barzan L, Pin M. Extra-capsular dissection in benign parotid tumors. *Oral Oncol*. 2012 Oct;48(10):977–9.
78. Cristofaro MG, Allegra E, Giudice A, Colangeli W, Caruso D, Barca I, et al. Pleomorphic Adenoma of the Parotid: Extracapsular Dissection Compared with Superficial Parotidectomy—A 10-Year Retrospective Cohort Study. *Sci World J*. 2014 Jan;1–4.
79. Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J, Thode B, et al. Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993 Jan;65(1):27–31.
80. Åström A, Voz M, Kas K, Röjjer E. Conserved Mechanism of PLAG1 Activation in Salivary Gland Tumors with and without Chromosome 8q12 Abnormalities Identification of SII as a New Fusion Partner. *Cancer Res*. 1999;59:918–23.
81. Hibbard MK, Kozakewich HP, Dal Cin P, Sciort R, Tan X, Xiao S, et al. PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. *Cancer Res*. 2000 Sep 1;60(17):4869–72.
82. Zatkova A, Rouillard J-M, Hartmann W, Lamb BJ, Kuick R, Eckart M, et al. Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes, Chromosom Cancer*. 2004 Feb;39(2):126–37.

83. Pallasch CP, Patz M, Park YJ, Hagist S, Eggle D, Claus R, et al. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3255–64.
84. Agaram NP, Laquaglia MP, Ustun B, Guo T, Wong GC, Socci ND, et al. Molecular Characterization of Pediatric Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res*. 2008 May 15;14(10):3204–15.
85. Matsuyama A, Hisaoka M, Hashimoto H. PLAG1 expression in mesenchymal tumors: an immunohistochemical study with special emphasis on the pathogenetical distinction between soft tissue myoepithelioma and pleomorphic adenoma of the salivary gland. *Pathol Int*. 2012 Jan;62(1):1–7.
86. Debiec-Rychter M, Van Valckenborgh I, Van den Broeck C, Hagemeijer A, Van de Ven WJ, Kas K, et al. Histologic localization of PLAG1 (pleomorphic adenoma gene 1) in pleomorphic adenoma of the salivary gland: cytogenetic evidence of common origin of phenotypically diverse cells. *Lab Invest*. 2001 Sep;81(9):1289–97.
87. Pusztaszeri MP, Faquin WC. Update in salivary gland cytopathology: Recent molecular advances and diagnostic applications. *Semin Diagn Pathol*. Dec 19;
88. Pitts DB, Hilsinger RL, Karandy E, Ross JC, Caro JE. Fine-needle aspiration in the diagnosis of salivary gland disorders in the community hospital setting. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992 May;118(5):479–82.
89. Rodriguez HP, Silver CE, Moisa II, Chacho MS. Fine-needle aspiration of parotid tumors. *Am J Surg*. 1989 Oct;158(4):342–4.
90. Shaha AR, Webber C, DiMaio T, Jaffe BM. Needle aspiration biopsy in salivary gland lesions. *Am J Surg*. 1990 Oct;160(4):373–6.
91. Stanley MW. Selected problems in fine needle aspiration of head and neck masses. *Mod Pathol*. 2002 Mar;15(3):342–50.
92. Kline TS, Merriam JM, Shapshay SM. Aspiration biopsy cytology of the salivary gland. *Am J Clin Pathol*. 1981 Sep;76(3):263–9.
93. MacLeod CB, Frable WJ. Fine-needle aspiration biopsy of the salivary gland: problem cases. *Diagn Cytopathol*. 1993 Jan;9(2):216–24; discussion 224–5.
94. O'Dwyer P, Farrar WB, James AG, Finkelmeier W, McCabe DP. Needle aspiration biopsy of major salivary gland tumors. Its value. *Cancer*. 1986 Feb 1;57(3):554–7.

95. Layfield LJ, Tan P, Glasgow BJ. Fine-needle aspiration of salivary gland lesions. Comparison with frozen sections and histologic findings. *Arch Pathol Lab Med*. 1987 Apr;111(4):346–53.
96. Bottles K, Ferrell LD, Miller TR. Tyrosine crystals in fine needle aspirates of a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Acta Cytol*. 1984;28(4):490–2.
97. Jiménez-Heffernan JA, Ortega L, Viguer JM. Cytologic features of oncocytic pleomorphic adenoma. *Diagn Cytopathol*. 2001 Feb;24(2):147–8.
98. Murty DA, Sodhani P. Intranuclear inclusions in pleomorphic adenoma of salivary gland: a case report. *Diagn Cytopathol*. 1993 Jan;9(2):194–6.
99. Klijanienko J, Vielh P. Fine-needle sampling of salivary gland lesions. I. Cytology and histology correlation of 412 cases of pleomorphic adenoma. *Diagn Cytopathol*. 1996 May;14(3):195–200.
100. Orell S, Klijanienko J. Head and neck; salivary glands. In: Orell S, Sterrett G, editors. *Fine needle aspiration Cytology*. 5th ed. New York: Elsevier Churchill Livingstone; 2012. p. 38–76.
101. Behzatoglu K, Bahadir B, Huq GE, Kaplan HH. Spontaneous infarction of a pleomorphic adenoma in parotid gland: diagnostic problems and review. *Diagn Cytopathol*. 2005 Jun;32(6):367–9.
102. Klitz B, Pitman M. Carcinoma Ex Pleomorphic Adenoma of the parotid Gland: Pitfalls in fine needle Aspiration Biopsy Diagnosis. *Acta Cytol*. 1994;38(5):855.
103. Klijanienko J, El-Naggar AK, Vielh P. Fine-needle sampling findings in 26 carcinoma ex pleomorphic adenomas: diagnostic pitfalls and clinical considerations. *Diagn Cytopathol*. 1999 Sep;21(3):163–6.
104. Nigam S, Kumar N, Jain S. Cytomorphologic spectrum of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Acta Cytol*. 2004;48(3):309–14.
105. Cramer H, Layfield L, Lampe H. Fine needle aspiration of salivary gland lesions. *Cytopathol Ann*. 1993. p. 181–206.
106. Jayaram N, Ashim D, Rajwanshi A, Radhika S, Banerjee CK. The value of fine-needle aspiration biopsy in the cytodiagnosis of salivary gland lesions. *Diagn Cytopathol*. 1989 Jan;5(4):349–54.
107. Hajdu SI, Ehya H, Frable WJ, Geisinger KR, Gompel CM, Kern WH, et al. The value and limitations of aspiration cytology in the diagnosis of primary tumors. A symposium. *Acta Cytol*. 1989;33(6):741–90.

108. Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E. Pleomorphic adenoma of parotid gland with cystic degeneration. *J Laryngol Otol.* 1994 May;108(5):446–8.
109. Stanley MW, Lowhagen T. Mucin production by pleomorphic adenomas of the parotid gland: a cytologic spectrum. *Diagn Cytopathol.* 1990 Jan;6(1):49–52.
110. Nasuti JF, Yu GH, Gupta PK. Fine-needle aspiration of cystic parotid glands lesions: an institutional review of 46 cases with histologic correlation. *Cancer.* 2000 Apr 25;90(2):111–6.
111. Layfield LJ, Gopez E V. Cystic lesions of the salivary glands: cytologic features in fine-needle aspiration biopsies. *Diagn Cytopathol.* 2002 Oct;27(4):197–204.
112. Brachtel EF, Pilch BZ, Khettry U, Zembowicz A, Faquin WC. Fine-needle aspiration biopsy of a cystic pleomorphic adenoma with extensive adnexa-like differentiation: differential diagnostic pitfall with mucoepidermoid carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 2003 Feb;28(2):100–3.
113. Siddiqui NH, Wu S-J. Fine-needle aspiration biopsy of cystic pleomorphic adenoma with adnexa-like differentiation mimicking mucoepidermoid carcinoma: a case report. *Diagn Cytopathol.* 2005 Apr;32(4):229–32.
114. Jacobs JC. Low grade mucoepidermoid carcinoma ex pleomorphic adenoma. A diagnostic problem in fine needle aspiration biopsy. *Acta Cytol.* 1994;38(1):93–7.
115. Kapadia SB, Dusenbery D, Dekker A. Fine needle aspiration of pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Acta Cytol.* 1997;41(2):487–92.
116. Lee SS, Cho KJ, Jang JJ, Ham EK. Differential diagnosis of adenoid cystic carcinoma from pleomorphic adenoma of the salivary gland on fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol.* 1996;40(6):1246–52.
117. Viguer JM, Jiménez-Heffernan JA, Vicandi B, López-Ferrer P, Navarro M. Cytologic diagnostic accuracy in pleomorphic adenoma of the salivary glands during 2 periods. A comparative analysis. *Acta Cytol.* 2007;51(1):16–20.
118. Carrillo R, Poblet E, Rocamora A, Rodriguez-Peralto JL. Epithelial-myoeplithelial carcinoma of the salivary gland. Fine needle aspiration cytologic findings. *Acta Cytol.* 1989;34(2):243–7.
119. Miliauskas JR, Orell SR. Fine-needle aspiration cytological findings in five cases of epithelial-myoeplithelial carcinoma of salivary glands. *Diagn Cytopathol.* 2003 Mar;28(3):163–7.

120. Klijanienko J, Vielh P. Salivary carcinomas with papillae: cytology and histology analysis of polymorphous low-grade adenocarcinoma and papillary cystadenocarcinoma. *Diagn Cytopathol.* 1998 Oct;19(4):244–9.
121. Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. Assessment of p63 expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and basal cell and canalicular adenomas. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2004 May;97(5):613–9.
122. Genelhu MCLS, Gobbi H, Soares FA, Campos AHJFDM, Ribeiro CA, Cassali GD. Immunohistochemical expression of p63 in pleomorphic adenomas and carcinomas ex-pleomorphic adenomas of salivary glands. *Oral Oncol.* 2006 Feb;42(2):154–60.
123. Geisinger KR, Reynolds GD, Vance RP, McGuirt WF. Adenoid cystic carcinoma arising in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. An aspiration cytology and ultrastructural study. *Acta Cytol.* 1985;29(4):522–6.
124. Verma K, Kapila K. Role of fine needle aspiration cytology in diagnosis of pleomorphic adenomas. *Cytopathology.* 2002 Apr;13(2):121–7.
125. Das DK, Anim JT. Pleomorphic adenoma of salivary gland: to what extent does fine needle aspiration cytology reflect histopathological features? *Cytopathology.* 2005 Apr;16(2):65–70.
126. Assad L, Treaba D, Ariga R, Bengana C, Kapur S, Bhattacharya B, et al. Fine-needle aspiration of parotid gland schwannomas mimicking pleomorphic adenoma: a report of two cases. *Diagn Cytopathol.* 2004 Jan;30(1):39–40.
127. Domanski HA. Intravenous pyogenic granuloma mimicking pleomorphic adenoma in a fine needle aspirate. A case report. *Acta Cytol.* 1999;43(3):439–41.
128. Saad RS, Takei H, Lipscomb J, Ruiz B. Nodular fasciitis of parotid region: a pitfall in the diagnosis of pleomorphic adenomas on fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol.* 2005 Sep;33(3):191–4.
129. Stanley MW, Horwitz CA, Bardales RH, Stern SJ, Korourian S. Basal cell carcinoma metastatic to the salivary glands: differential diagnosis in fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol.* 1997 Mar;16(3):247–52.
130. Cheuk K, Chan JKC. *Diagnostic Histopathology of Tumors* 3rd edition. Fletcher CDM, editor. London; 2000. 231-311 p.
131. Mair S, Leiman G. Benign neurilemmoma (schwannoma) masquerading as a pleomorphic adenoma of the submandibular salivary gland. *Acta Cytol.* 1989;33(6):907–10.

132. Kern SB. Necrosis of a Warthin's tumor following fine needle aspiration. *Acta Cytol.* 1988;32(2):207–8.
133. De Araújo VC, de Sousa SO, Carvalho YR, de Araújo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2000 Sep;8(3):195–202.
134. Ogawa Y, Toyosawa S, Ishida T, Ijuhin N. Keratin 14 immunoreactive cells in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Virchows Arch.* 2000 Jul;437(1):58–68.
135. Ogawa Y, Kishino M, Atsumi Y, Kimoto M, Fukuda Y, Ishida T, et al. Plasmacytoid cells in salivary-gland pleomorphic adenomas: evidence of luminal cell differentiation. *Virchows Arch.* 2003 Nov;443(5):625–34.
136. Zhu X, Zhang J, Chen X, Feng X. Comparison of Ki-67, cyclin E, and p63 in benign and malignant human pleomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* Elsevier; 2012 May;113(5):667–72.
137. Daa T, Nakamura I, Yada N, Arakane S, Nishida H, Kashima K, et al. PLAG1 and CYLD do not play a role in the tumorigenesis of adenoid cystic carcinoma. *Mol Med Rep.* 2013 Apr;7(4):1086–90.

X ANEXOS

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D^a Almudena Castro Conde, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de la investigadora Blanca Vicandi Plaza del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "La Paz" para que se realice el estudio titulado **'UTILIDAD DE LA P.A.A.F. EN EL DIAGNÓSTICO DEL ADENOMA PLEOMORFO DE GLANDULA SALIVAL'**, código HULP: **PI-1777**,

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Es adecuado el procedimiento de confidencialidad y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por la investigadora Blanca Vicandi Plaza del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "La Paz", como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 3 de julio de 2014

Firmado: D^a Almudena Castro Conde

